

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

STUDIUM SYSTÉMŮ ZALOŽENÝCH NA FOSFOLIPIDECH PRO
SONOGRAFICKÉ APLIKACE.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

MARTIN ÜBERALL

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

STUDIUM SYSTÉMŮ ZALOŽENÝCH NA FOSFOLIPIDECH PRO SONOGRAFICKÉ APLIKACE.

STUDY OF SYSTEM BASED ON PHOSPHOLIPIDS FOR SONOGRAPHICAL APPLICATION.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARTIN ÜBERALL

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0814/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Martin Ůberall	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Krutišová Ing. Tereza Halasová, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Studium systémů založených na fosfolipidech pro sonografické aplikace.

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o studiu systémů fosfolipidů využitelných u sonografii se zvláštním zaměřením na solubilizační schopnosti těchto systémů.
2. Seznámit se s možnými metodami stanovení solubilizační kapacity ve zmíněných systémech.
3. Navrhnout a provést základní experimenty pro porovnání solubilizační kapacity systémů založených na fosfolipidech.
4. Zhodnotit výsledky s ohledem na využití těchto systémů v ultrasonografii a jako nosiče biologicky aktivních látek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Martin Ůberall
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V bakalářské práci byly pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie studovány solubilizační schopnosti povrchově aktivních látek a fosfolipidů. Byla zjišťována koncentrace látek solubilizovaných uvnitř zmíněných systémů. Zástupcem povrchově aktivních látek byl zvolen cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), sodium dodecylbenzensulfonát (SDBS) a Triton X-100. Zástupcem fosfolipidů byl zvolen lecithin a komerčně dostupný přípravek SonoVue®. Solubilizační schopnosti byly zkoumány pomocí hydrofobních solutů Sudan Red G (SRG), Oil Red O (ORO) a 1-naphtolu z důvodu získání modelového systému solubilizovaných léčiv, popřípadě vitaminů, které jsou taktéž hydrofobního charakteru. Chování jednotlivých solutů v tenzidech bylo zkoumáno v mírně polárním prostředí fyziologického roztoku (0,15 M roztok NaCl), chování solutů v lecithinu bylo naopak zkoumáno v prostředí Mili-Q vody.

Bylo zjištěno, že koncentrace solubilizovaných hydrofobních solutů uvnitř micel tenzidů odpovídá řádově desítkám až stovkám mikromolů na litr. S rostoucí koncentrací tenzidů roste koncentrace solubilizovaných solutů. Výsledky získané během této práce mohou být využity k dalším experimentům či výzkumu v oblasti zaměřené na solubilizaci léčiv v kontrastních látkách využívaných v ultrasonografii.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to determine solubilizing capacity of surfactants and phospholipids using the UV-VIS spectrophotometry. The concentrations of solubilized substances within these systems was further determined. From the surfactant group, three representatives were selected, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) and Triton X-100. From the phospholipid group, lecithin and commercially available SonoVue® were chosen. The solubilizing capacity was determined using hydrophobic solutes Sudan Red G (SRG), Oil Red O (ORO) and 1-naphtol in order to obtain a model system of solubilized drugs or vitamins which are also hydrophobic. The behavior of solutes in surfactants was determined in a moderate polar medium of physiological saline (0.15 M NaCl), the behavior of solutes in lecithin was conversely determined in Mili-Q water medium.

The determined concentration of solubilized hydrophobic solutes inside the micelles of surfactants is within the range of tens to hundreds of micromoles per liter. With increasing concentration of surfactant increases the concentration of solubilized solutes. The results obtained in this work can be used for further experiments and research focused on solubilization of drugs in contrast agents used in ultrasonography.

KLÍČOVÁ SLOVA

solubilizace, tenzidy, mikrobubliny, UV-VIS, cílená distribuce léčiv, SonoVue®

KEYWORDS

solubilization, surfactants, microbubbles, UV-VIS, target drug delivery, SonoVue®

ÜBERALL, M. Studium systémů založených na fosfolipidech pro sonografické aplikace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. a konzultantkám Ing. Tereze Halasové, Ph.D. a Ing. Tereze Krutišové za trpělivost, vstřícnost a cenné rady. Dále své rodině a přítelkyni za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Ultrazvuk.....	8
2.1.1	Ultrazvukové snímkování	8
2.1.2	Různé vlastnosti ultrazvuku, působení ultrazvuku na organismus a léčiva .	8
2.2	Mikrobubliny.....	9
2.2.1	Příprava mikrobublin.....	14
2.3	Asociativní (micelární) koloidy	15
2.3.1	Tvary micel	16
2.3.2	Kritická micelární koncentrace (CMC).....	16
2.3.3	Faktory ovlivňující CMC	16
2.3.4	Krafftova teplota	17
2.3.5	Agregační číslo.....	17
2.3.6	Solubilizace	17
2.4	UV-VIS absorpční spektrofotometrie	18
2.4.1	Absorbance.....	18
2.4.2	Lambeert-Beerův zákon	19
2.4.3	Absorpční křivky.....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
3.1	Použité chemikálie	20
3.2	Přístroje a zařízení	22
3.3	Příprava zásobních roztoků	22
3.3.1	Zásobní roztoky tenzidů	22
3.3.2	Zásobní roztok lecithinu	23
3.3.3	Zásobní roztoky hydrofobních solutů	23
3.4	Příprava vzorků	23
3.4.1	Vzorky k zjištění molárních extinkčních koeficientů solutů v tenzidech a v lecithinu	23
3.4.2	Vzorky pro výpočet koncentrace solutů solubilizovaných v micelách tenzidů	23
3.4.3	Vzorky pro výpočet koncentrace solutů solubilizovaných v lecithinu	24
3.5	Metoda měření.....	24
3.5.1	UV-VIS Spektrofotometrie	24
3.6	Standardní vyhodnocení dat	24
3.6.1	Zjištění molárního extinkčního koeficientu solutů v tenzidech a v lecithinu	24
3.6.2	Zjištění koncentrace solutů uvnitř micel tenzidů, v lecithinu a v Sonovue® ..	24

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1	Molární extinkční koeficient solutů v tenzidech a v lecithinu	25
4.1.1	CTAB	25
4.1.2	SDBS	26
4.1.3	Triton X-100.....	27
4.1.4	Lecithin.....	27
4.2	Koncentrace solutů solubilizovaných uvnitř micel tenzidů, v lecithinu a v SonoVue®	28
4.2.1	Solubilizační schopnosti CTAB, SDBS a Tritonu X-100	28
4.2.2	Solubilizační schopnosti Lecithinu a SonoVue®	31
5	ZÁVĚR.....	34
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	35
7	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	37
7.1	Seznam zkratk	37
7.2	Seznam symbolů	37
8	PŘÍLOHY	38
8.1	Příloha 1	38
8.2	Příloha 2	39
8.3	Příloha 3	39
8.4	Příloha 4	40

1 ÚVOD

Kolik léčiva, respektive jaká koncentrace léčiva se je schopna solubilizovat do micel tenzidů, fosfolipidů, popřípadě kontrastních látek? Proč se vlastně zabývat solubilizačními schopnostmi látek? Proč studovat systémy založené na fosfolipidech pro sonografické aplikace? Na tyto otázky by nám alespoň částečně měla poskytnout odpověď právě tato bakalářská práce.

Bakalářská práce je zaměřena na solubilizační schopnosti vybraných tenzidů rozpuštěných ve fyziologickém roztoku a solubilizační schopnosti lecithinu rozpuštěného v Mili-Q vodě. Solubilizační schopnosti byly studovány pomocí hydrofobních solutů. Lecithin byl zvolen díky své podobnosti ke komerčně dostupné směsi fosfolipidů a dalších látek zvanou SonoVue[®], která se používá jako kontrastní látka v ultrasonografii v podobě mikrobublin plněných plynem, fluoridem sírovým.

V dnešní době se medicínský výzkum zabývá především potenciálními nosiči léčiv a cílenou distribucí léčiv. Kontrastní látka SonoVue[®], která je schopna tvořit mikrobubliny, by mohla být využita jako nosičový systém, na který by bylo možné navázat hydrofobní léčivo, cytostatika, popřípadě některé vitamíny. Navázání těchto látek je možné buď na povrch struktury mikrobublin SonoVue[®], nebo začleněním (solubilizací) přímo dovnitř těchto mikrobublin. Obecně by nosiče léčiv měly umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a selektivní účinek zaměřený na cílovou tkáň a tím tak omezit nežádoucí účinky terapií. Dále by měly zajistit rozpustnost ve vodě původně nerozpustným aktivním látkám nebo potlačit odolnost cílové tkáně k léčivu. Existuje celá řada typů nosičových systémů, největší pozornost se však věnuje nosičům cytostatik a to především z důvodu častého výskytu a závažnosti nádorových onemocnění, která mají dodnes malou účinnost léčby.

Cílem této práce je navrhnout a provést základní experimenty vedoucí k zjištění koncentrace hydrofobních solutů solubilizovaných ve fosfolipidech (lecithin, SonoVue[®]) pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ultrazvuk

Ultrazvuk je zobrazovací technika pro klinickou diagnózu, která je zajímavá z hlediska pohodlí, bezpečnosti a nákladů [1]. Diagnostické aplikace zobrazování pomocí ultrazvuku jsou dnes populární, protože je tato metoda neinvazivní a obecně levnější oproti jiným zobrazovacím technikám. V dnešní době již existují přenosné ultrazvuky. Ultrazvuk poskytuje, v reálném čase, obraz měkkých tkání, jejich strukturu, pohyblivost a prokrvení. Výsledný obraz je zobrazený buď ve 2D, nebo ve 3D, záleží na konkrétním typu ultrazvuku [2]. Při této metodě nevzniká žádné ionizující záření ani magnetické pole. Metoda nevyžaduje stínění nebo různá bezpečnostní opatření na rozdíl od známých konkurenčních technologií, například magnetická rezonance, CT nebo rentgen.

2.1.1 Ultrazvukové snímkování

Ultrazvukové vlny se v těle odrážejí (rozptylují) od různých tkání. Některé vlny ale mohou být tkáněmi absorbovány. Míra absorpce ultrazvukových vln nám určuje povahu zpětných ozvěn (echa) zjištěných na povrchu těla, ze kterých je postaven výsledný obraz ultrazvuku. Rozsah, do jakého se ultrazvukové vlny odrážejí od daného rozhraní, závisí na rozdílu v akustické impedanci materiálů na každé straně. Principem je rozdílná charakteristika akustického signálu odraženého od pevných tkání. Pro rovinné vlny sinusového průběhu je to produkt hustoty materiálu a akustická rychlost [3]. To znamená, že odrazy od míst, které obsahují různorodé materiály, jsou silnější než ty z oblastí podobného složení. Proto může ultrazvuk téměř kompletně odrážet signál od míst, která obsahují vzduch nebo kosti zabráňující zobrazování základních struktur. Ultrazvukové vlny mají frekvenci nad rámeček slyšitelný pro člověka. Ultrazvuk obvykle pracuje ve frekvenčním rozsahu 1–10 MHz, kdežto lidské ucho vnímá zvukové vlny o rozsahu 20–20 000 Hz. Ultrazvuk byl dříve uplatňován jako nástroj pro tepelnou ablaci (zneškodnění) nádorů. V dnešní době se využívá jeho netermálních jevů, zvláště v medicínských aplikacích pro cílenou distribuci léčiv [4].

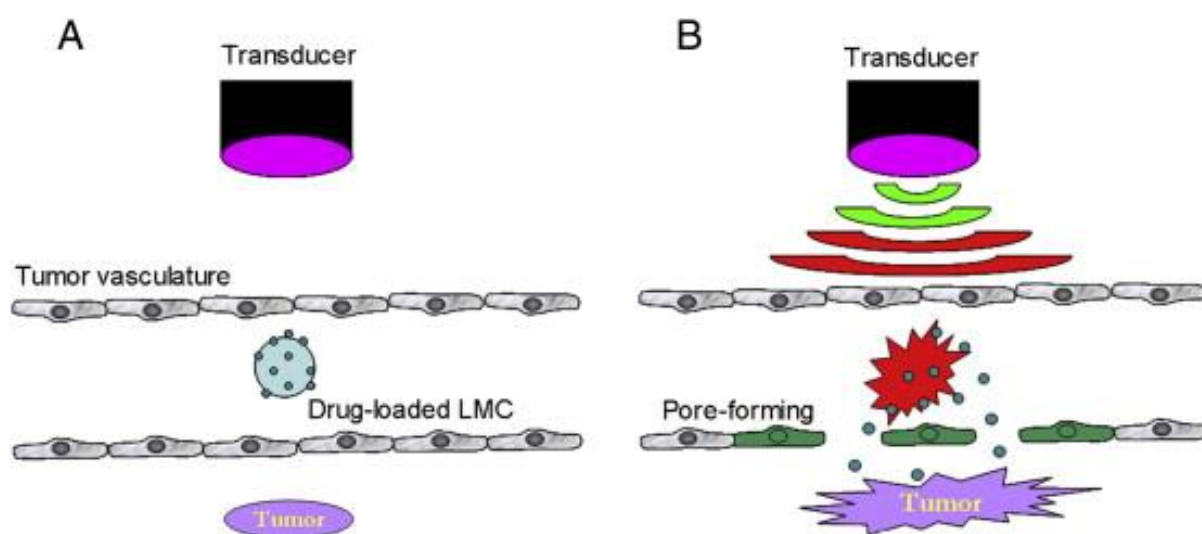
Snímky z ultrazvuku obvykle nemají ostrý kontrast, protože zobrazovanou oblast zastíňují některé tkáně. To je krajně nežádoucí, a proto se tento problém řeší pomocí ultrazvukových kontrastních látek pro lékařské ultrazvukové zobrazování. Kontrastní látky jsou tvořeny různými materiály. Různé druhy kontrastních látek mohou mít odlišné složení a každá může pracovat na jiném principu.

Ultrazvuk může zvýšit účinky transdermální distribuce léčiv, protinádorových léčiv a účinky v genové terapii [4].

2.1.2 Různé vlastnosti ultrazvuku, působení ultrazvuku na organismus a léčiva

Působením ultrazvuku se mohou látky dostávat do různých tkání, sraženin či do kůže. Ultrazvuk může mít přímý vliv na membrány (např. membrány kontrastních látek), jako je změna propustnosti membrány nebo absorpce léčiv do buněk či tkání. Vlivy ultrazvuku můžeme dělit na primární, způsobené mechanickými složkami ultrazvukového pole, a sekundární, způsobené jinými druhy energie, v něž se mechanická energie v průběhu absorpce transformovala (tepelná, chemická, elektrická). Je-li kritériem způsob interakce, pak je možné mluvit o působení přímém, vyvolaném účinnými faktory během aplikace ultrazvuku a nepřímém, zprostředkovaném fyzikálně-chemickými změnami prostředí [4].

Studie prokázaly, že se použitím vysokofrekvenčních ultrazvukových vln (1–10 MHz) v kombinaci s kontrastními látkami může zvýšit intracelulární dodávání léků do buněk a tkání. Působením ultrazvuku se mikrobubliny střídavě smršťují a rozšiřují v průběhu jednotlivých fází střídání vyšších a nižších tlaků ultrazvukových vln. Mikrobubliny tedy oscilují a předpokládá se, že hrají významnou roli při uvolňování a absorpci léčiv [5]. Nelineární kmity vyvolané intenzivním průtokem kapaliny kolem mikrobublin se nazývají microstreaming („mikroproudění“) [6]. Mikrobubliny rychle zvyšují svůj objem díky vyšším frekvencím ultrazvuku a vyšším tlakům (neinerciální kavitace), vzápětí kolabují a dělí se na fragmenty. Tyto jevy jsou často doprovázeny vznikem nárazových vln v okolním prostředí. Microstreaming a nárazové vlny mohou přechodně způsobit perforaci plazmatické membrány okolních buněk a tím pádem i zvýšení vnitrobuněčné absorpce léčiv, jak je znázorněno na Obr. 1 [5].



Obr. 1: Schematické znázornění léčby rakoviny cytostatikem Paclitaxel (rostlinný alkaloid), navázaném na komplexu lipozomových mikrobublin, za pomoci ultrazvuku. A) Při nízkých frekvencích ultrazvukových vln „tečou“ mikrobubliny volně kolem cílového bodu, cytostatika zůstávají připojena k lipidové skořápce mikrobublin a nemohou prostou difúzí překročit přes plazmatickou membránu k nádoru. B) Při vysokých frekvencích ultrazvuku dochází k prasknutí mikrobublin a uvolnění léčiv. Kromě kavitace a imploze mikrobublin rovněž zlepšuje propustnost plazmatické membrány procesem nazývaným sonoporace (tvorba pórů v membráně), což zvyšuje množství cytostatika vstupujícího do nádorových buněk [5]

2.2 Mikrobubliny

Objevení mikrobublin použitelných v sonografii se datuje kolem roku 1968 [7]. První literární údaje o použití kontrastních látek za účelem zlepšení kvality ultrazvukového signálu se datují od 60. let 20. století [8]. Mikrobubliny byly předmětem mnoha experimentů a teoretických analýz v průběhu posledních 100 let [7].

Mikrobubliny jsou komplexy, které jsou svou velikostí poměrně malé. Jejich velikost je obvykle menší než velikost červených krvinek, které mají v průměru 1–10 μm . Mikrobubliny se skládají z pouzdra, jehož chemické složení je různé, a z kulovitých dutin plněných vzduchem nebo dutin naplněných speciálním plynem k tomu určeným. Nejvhodnější plyny, kterými jsou mikrobubliny plněny, jsou perfluorokarbony, fluorid sírový

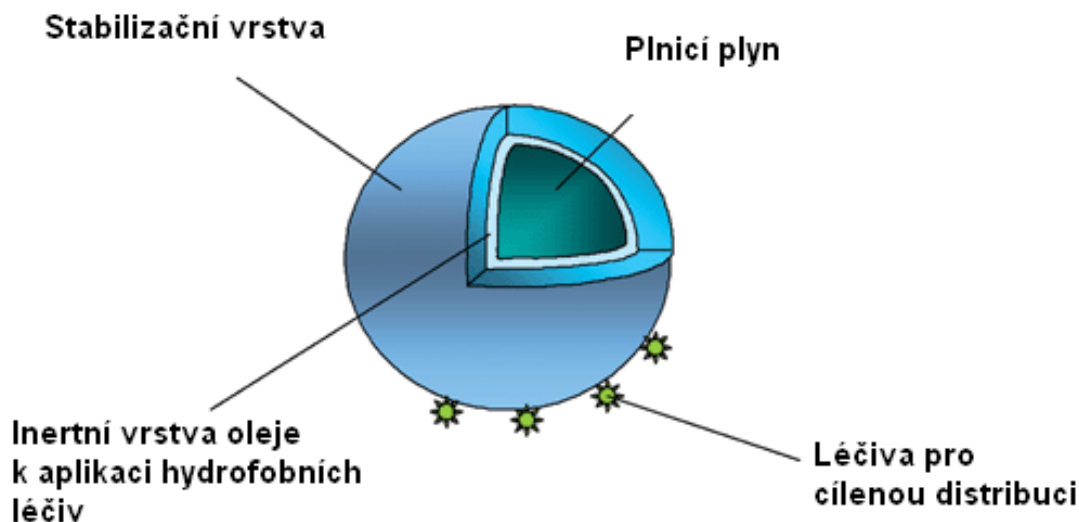
SF₆ nebo dusík. Perfluorokarbyny jsou myšleny zcela fluorované nižší uhlovodíky od perfluoroethanu počínaje po perfluorohexan [8]. Menších rozměrů mikrobublin je především docíleno změnou chemického složení pouzdra mikrobublin (albumin, lipidy, surfaktant) a právě použitím méně rozpustných plynů. Některé vlastnosti plynů, které se používají k výrobě mikrobublin a emulzí, jsou znázorněny v Tab. 1.

Tab. 1: Některé fyzikální vlastnosti materiálů používaných pro výrobu mikrobublin a emulzí [9]

Název sloučeniny	Molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹]	Teplota varu [°C]	Rozpustnost ve vodě
Dusík (N ₂)	28	-195,79	mírně / zřídka
Fluorid sírový (SF ₆)	147,07	-82,7	mírně / zřídka
Perfluoroethan (C ₂ F ₆)	138,01	-78,1	-
Perfluoropropan (C ₃ F ₈)	188,02	-36,7	nerozpustný
Perfluorobutan (C ₄ F ₁₀)	238,04	-2	nerozpustný
Perfluoropentan (C ₅ F ₁₂)	288,05	29	nerozpustný
Perfluorohexan (C ₆ F ₁₄)	338,06	59–60	nerozpustný
Perfluoroacetyl bromid (C ₈ F ₁₇ Br)	499	143	nerozpustný

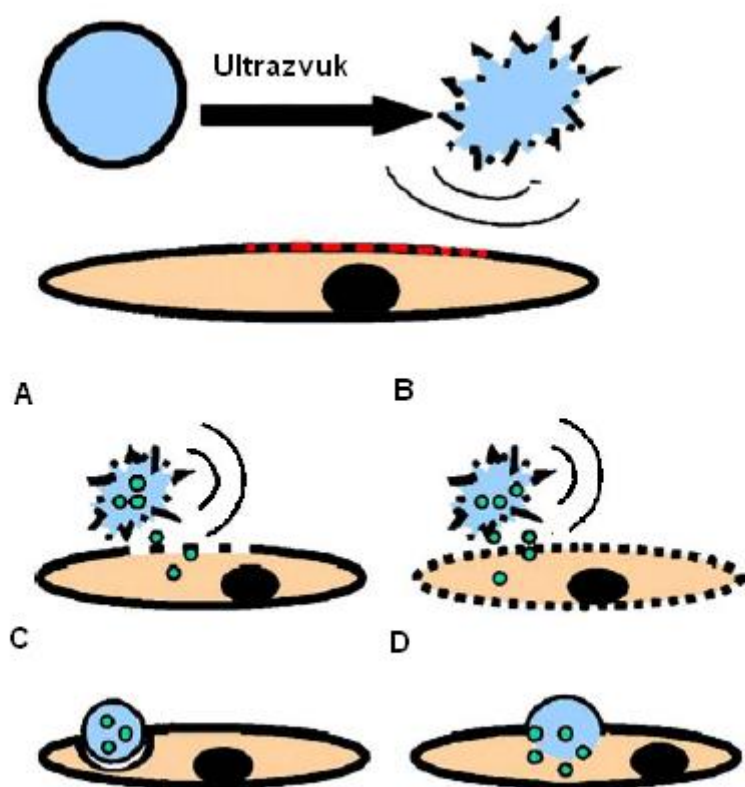
Mikrobubliny jsou méně odolné a méně stabilní v prostředí lidského těla (vůči biologickým tekutinám), zvláště když mají být použity jako kontrastní látky. Stabilita mikrobublin většinou závisí na okolním prostředí. V našem případě jde o krev. Hlavní faktory, které ovlivňují stabilitu mikrobublin, jsou teplota a tlak. Zvýšený tlak, který se vyskytuje zejména v srdci a v cévách při srdeční systole, představuje vyšší požadavky na stabilitu mikrobublin. Dále nesmí být opomenuta koncentrace rozpuštěných plynů, které mají vysoké povrchové napětí a koncentrační gradient na rozhraní kapalina-plyn. Důležitou roli také hraje složení plynu uvnitř mikrobubliny a jeho rozpustnost. Mikrobubliny plněné vzduchem se v krvi rozpadají rychleji. Proto se jich nevyužívá tak často [9].

Pro medicínské aplikace jsou mikrobubliny stabilizovány povrchově aktivními látkami, denaturovaným albuminem lidského séra nebo syntetickými polymery. Schéma mikrobubliny s povrchově aktivní látkou je blíže popsán na Obr. 2.

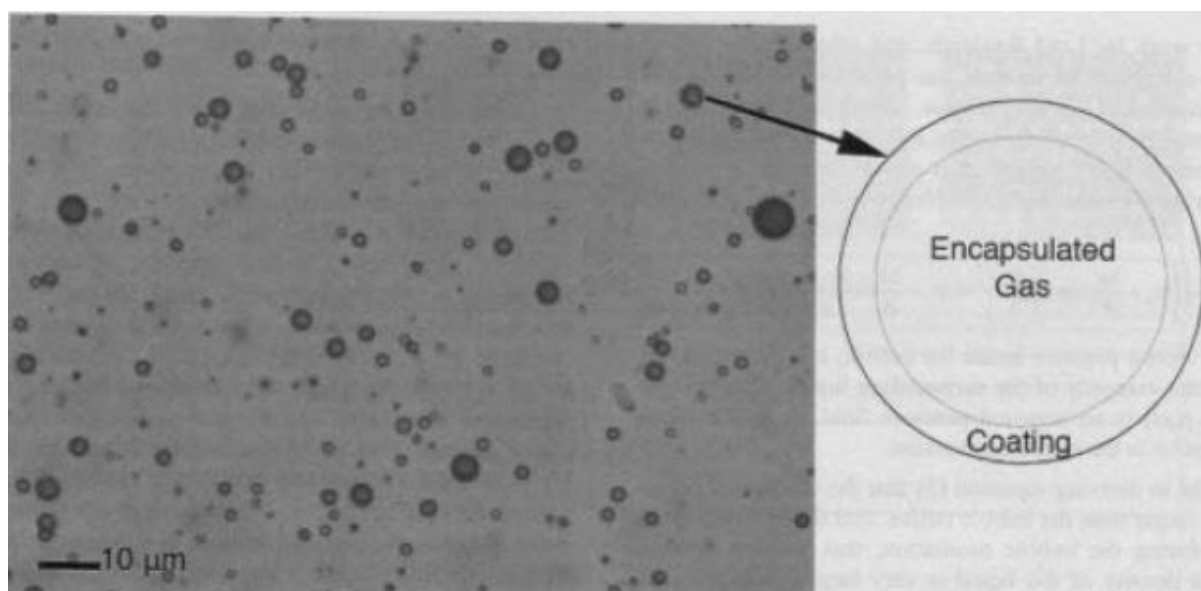


Obr. 2: Schéma mikrobubliny s vnější vrstvou. Vnější vrstva může být buď povrchově aktivní látka, nebo vrstva polymeru. Vnitřní vrstva je olejovitého charakteru a mohou se na ni vázat molekuly hydrofobního léčiva. Olejová vrstva může být taktéž využita k terapeutickým účelům. Vnitřní část mikrobublin je vyplněna plynem [8]

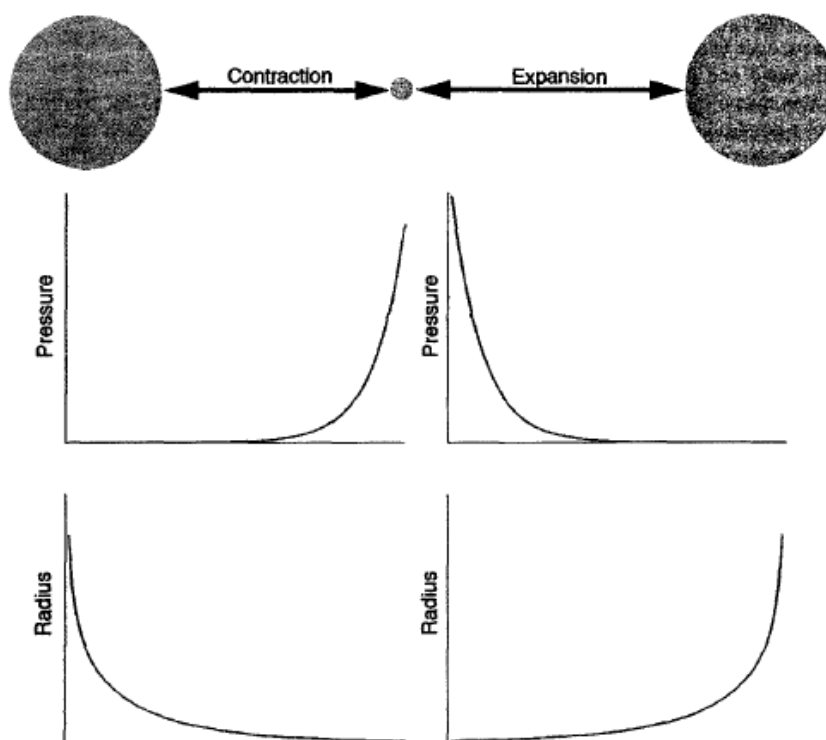
Příkladem povrchově aktivních látek jsou fosfolipidy. Fosfolipidy jsou látky amfifilního charakteru, což znamená, že jejich molekula obsahuje jak část hydrofilní, polární, tak i část hydrofobní, nepolární [8]. Mikrobubliny potažené povrchově aktivními látkami slouží k ochraně plynů uvnitř mikrobublin a mají tu výhodu, že jsou stabilní v lidském těle po značně delší dobu. Plyn pak hůře difunduje do krevního řečiště. Amfifilní molekuly mají tendenci se adsorbovat na povrchu mikrobubliny plynu. Tím, že se naváží na povrch mikrobubliny, sníží mezifázové napětí a poskytují bariéru proti difúzi plynů z mikrobubliny. První enkapsulované částičky kontrastních látek byly vyráběny mechanickým mícháním vzorku pacientovy krve. Mícháním vznikaly bubliny, které pak byly opětovně vstříkovány zpět do krevního oběhu. Všechny aktuální komerčně dostupné kontrastní látky používají nějaký typ zapouzdření ke zvýšení perzistence mikrobublin. Druhá generace mikrobublin ve své dutině obsahuje speciální plyn mnohem častěji než vzduch. Mezi zástupce druhé generace patří látky například Optison[®], SonoGen[®] a SonoVue[®] [10]. Různé experimenty in vitro a in vivo v poslední době prokázaly, že mikrobubliny obsahující perfluorokarbonový plyn, mohou být záměrně protrženy diagnostickým a terapeutickým ultrazvukem. Toto akusticky indukované „ničení“ mikrobublin podporuje cílenou distribuci léčiv. Otázkou však je, jak moc je účinné [8]. Destrukce mikrobublin pomocí ultrazvuku je zobrazena na Obr. 3. Destrukce mikrobublin ultrazvukem má za následek zvýšení permeability membrán díky smykovému napětí. Podílí se také na zvýšení teploty a aktivaci reaktivních kyslíkových radikálů [11].



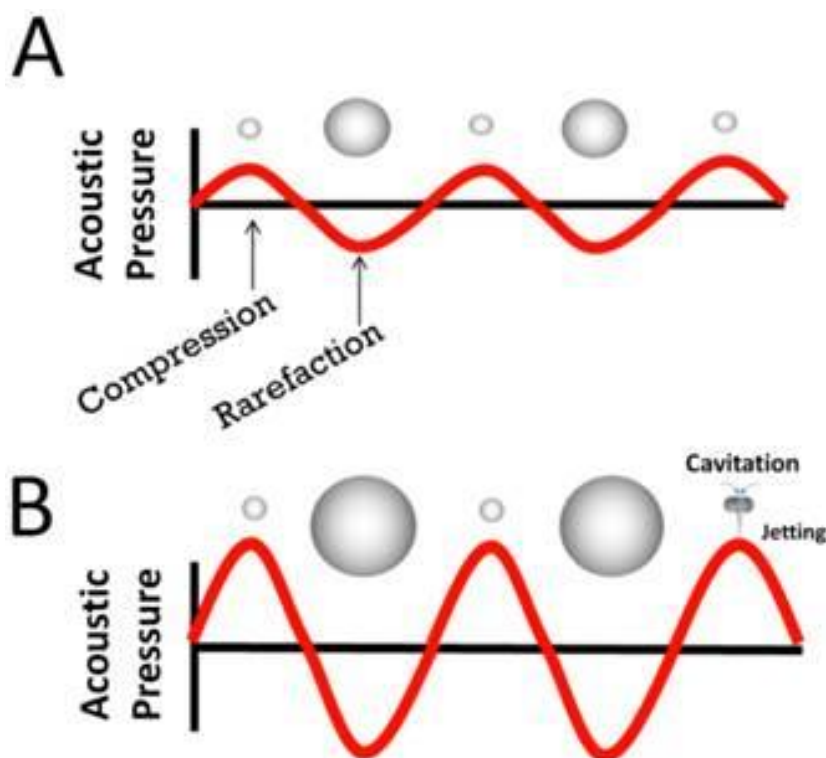
Obr. 3: Destrukce ultrazvukem a distribuce léčiv pomocí mikrobublin: A) přechodnými otvory vyvolanými smykovým napětím, B) zvýšenou tekutostí membrány, C) endocytózou mikrobublin, D) splynutím membrány mikrobublin s buněčnou membránou [10]



Obr. 4: Suspenze mikrobublin potažených fosfolipidovou vrstvou a schematické znázornění průřezu mikrobublin [8]



Obr. 5: Schematický obrázek ilustrující kontrakci a expanzi plynu mikrobubliny v odezvě na změny vnějšího tlaku způsobeného ultrazvukem [8]



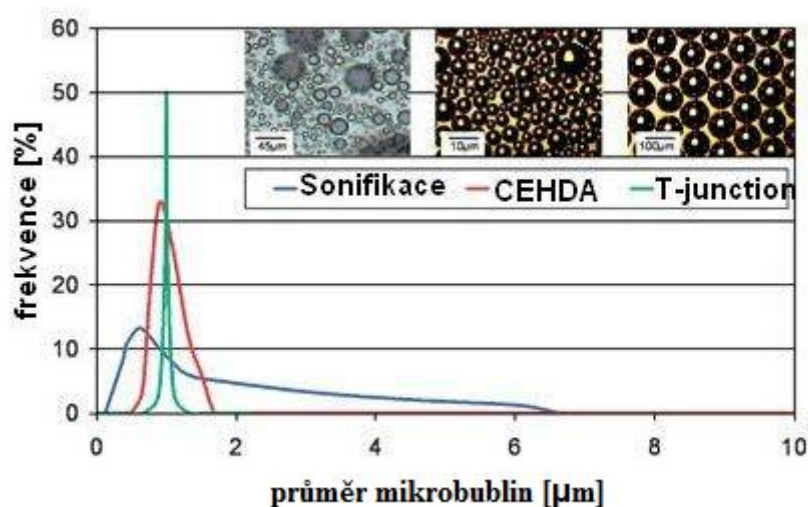
Obr. 6: Odezvy mikrobublin na ultrazvukové pole: A) mikrobubliny kmitají vzhledem k neustálým změnám ve vnějším tlaku způsobeným zvukovými vlnami. B) při zvýšení tlaku se mikrobubliny náhle zhroutlí, dochází k produkci 'vodotrysků', nárazových vln či jiných setrvačných jevů [12]

Suspenze mikrobublin je znázorněna na Obr. 4. Mikrobubliny působením ultrazvuku mění svůj tvar. Změna tvaru je způsobena stlačitelností plynu uvnitř mikrobubliny. Stlačitelný plyn umožňuje objemové expanze a smršťování mikrobublin v závislosti na frekvenci ultrazvukových vln. Díky tomu jsou mikrobubliny schopny efektivně rozptýlit ultrazvukové vlny. Plyn uvnitř mikrobubliny má menší hustotu než kapalina nebo pevná látka, proto mikrobubliny tvoří kapsy a struktury s nízkou hustotou. Tato vlastnost má řadu potenciálně významných medicínských aplikací, včetně cílené distribuce léčiv nebo léčení trombózy (srážení krve) [9]. Na Obr. 5 je znázorněna tlaková rovnováha na povrchu kulové plynové mikrobubliny suspendované v nekonečném množství kapaliny. Obr. 6 znázorňuje vliv ultrazvuku na stlačitelnost mikrobublin [8].

2.2.1 Příprava mikrobublin

První zapouzdřené mikrobubliny byly připraveny mícháním vzorku krve pacienta. Míchání je stále nejjednodušší a běžně používaná metoda pro přípravu mikrobublin. Dnes se k přípravě mikrobublin používá buď mechanická třepačka, ultrazvuk s nízkou frekvencí a vysokou intenzitou, koaxiální elektrohydrodynamická atomizace (CEHDA) nebo mikrofluidní zařízení. Různé způsoby přípravy mikrobublin pak ovlivňují výslednou distribuci velikosti mikrobublin (viz Obr. 7). Výsledná charakteristika mikrobublin, koncentrace a distribuce velikosti, je určena rychlostí, časem a energií protřepávání. Třepání může mít vliv i na vlastnosti svrchní vrstvy.

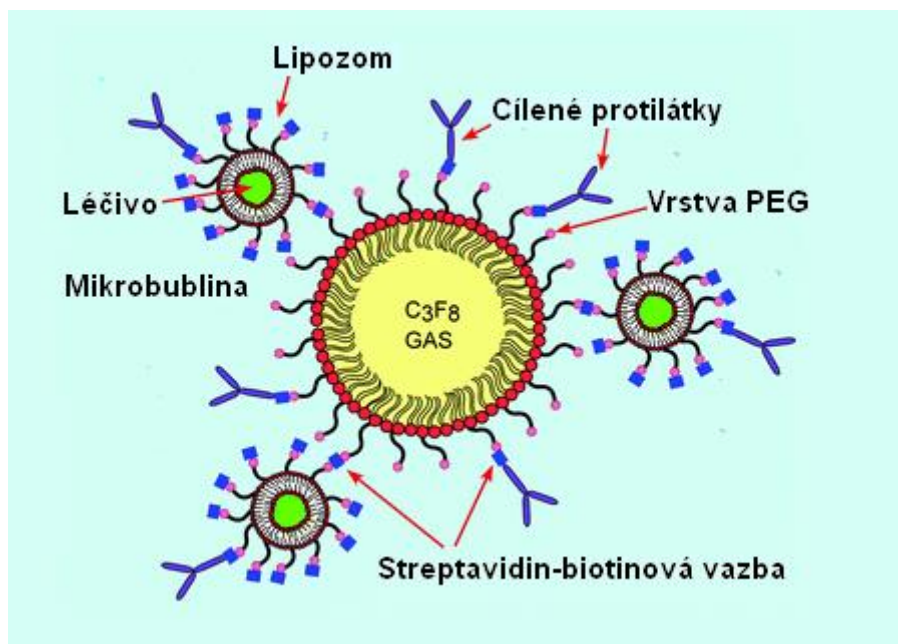
Klinicky schválené kontrastní látky jsou nejčastěji dodávány jako předem vytvořené mikrobubliny nebo lipozomy, které jsou jednoduše resuspendované před vlastní injekcí [8].



Obr. 7: Porovnání distribuce velikostí částic mikrobublin pro suspenze připravené za použití ultrazvuku, koaxiální elektrohydrodynamické atomizace (CEHDA) a mikrofluidního zařízení (T-junction) [8]

Další možností je použití mikro-spreje, který vytváří trvale vysoké koncentrace mikrobublin, které jsou klinicky významnější ve srovnání s tradičními monodisperzními mikrobublinami. Konečná koncentrace mikrobublin produkovaných mikro-sprejem je až tisíc mikrobublin v 1 ml fyziologického roztoku. Čas potřebný k výrobě jednoho mililitru vzorku obsahujícího tisíc mikrobublin je přibližně 10 minut. Při takovéto tvorbě mikrobublin lze

během jednoho kroku připravit a na mikrobubliny připojit lipozomy naplněné kvantovými tečkami (QDS) nebo fluoresceinem (viz Obr. 8) [13].

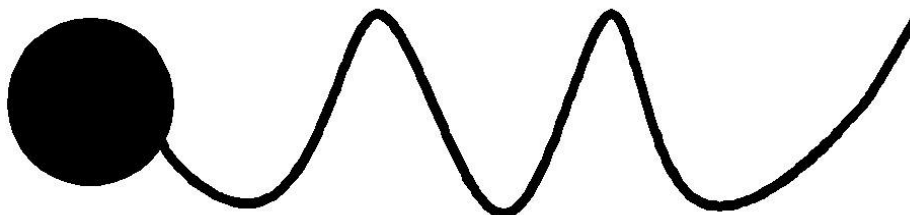


Obr. 8: Schéma mikrobubliny stabilizované vrstvou polyethylenglykolu. Na povrchu mikrobubliny jsou navázány cílené protilátky a lipozomy s enkapsulovaným léčivem značeným fluoresceinem, na kterých mohou být protilátky taktéž navázané. Napojení léčiva nebo lipozomu je zprostředkováno streptavidin-biotinovou vazbou [13]

2.3 Asociativní (micelární) koloidy

Termín „micela“ poprvé navrhl Duclaux v roce 1908 [14]. Micely jsou koloidně disperzní částice. Vznikají agregací amfipatických (amfifilních) molekul (viz Obr. 9) některých nízkomolekulárních látek (tenzidy, PAL) z jejich pravých roztoků po dosažení určité koncentrace roztoku. Tato koncentrace je nazývána jako kritická micelární koncentrace (CMC). Samotné micely nepotřebují být stabilizovány jinými látkami. Jejich koncentrace a velikost je určena okamžitými stavovými veličinami [15].

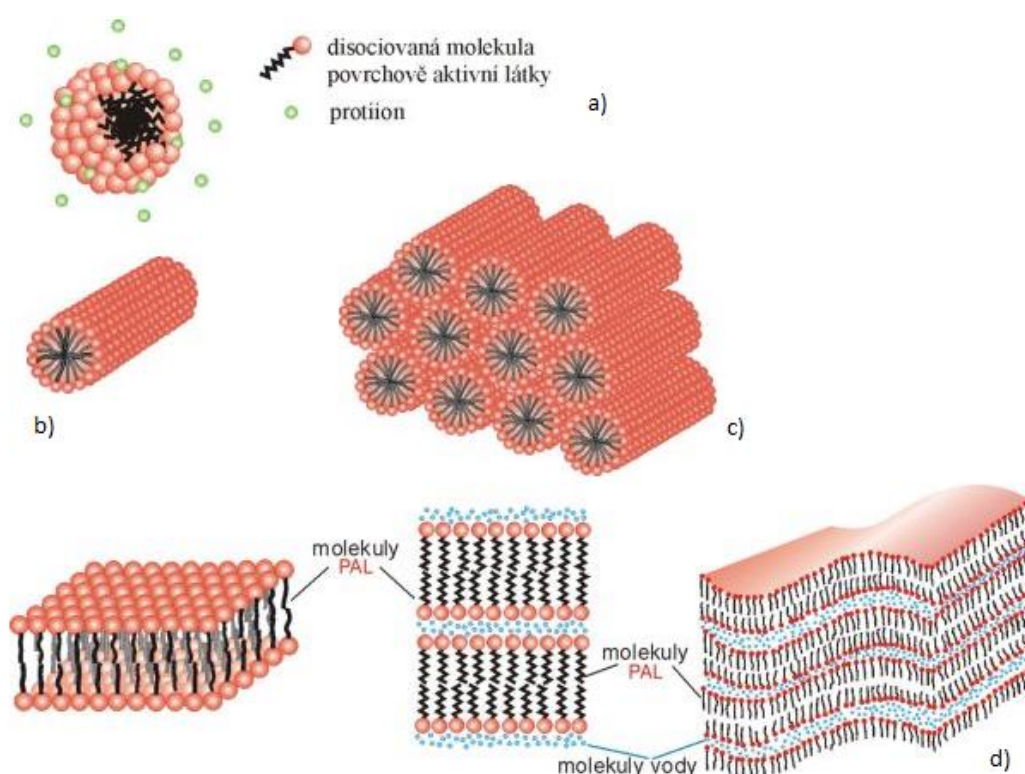
Formování micel je důležitý jev nejen z velkého množství povrchových jevů závislých na existenci micel v roztoku (solubilizace), ale také z důvodu ovlivňování dalších povrchových jevů, které nepřímo souvisí s micelami (snížení povrchového napětí). Micely jsou schopny katalyzovat některé organické reakce. Mají podobnost s biologickými membránami a globulárními proteiny [16].



Obr. 9: Struktura amfipatické molekuly – molekula je složena z kratší hydrofilní části a z delší hydrofobní části.

2.3.1 Tvary micel

Malé, kulovité, tzv. Hartleyovy micely vznikají ve zředěných vodných roztocích Obr. 10. Jejich poloměr odpovídá přibližně délce molekuly povrchově aktivní látky. Při vyšších koncentracích roztoku se rozměr micel zvětšuje a uhlovodíkové řetězce se začínají orientovat navzájem rovnoběžně. Vznikají válcovité útvary, které mohou utvářet hexagonální kapalně krystaly. Při ještě vyšších koncentracích se vytváří laminární, tzv. McBainovy micely. Jsou složeny ze dvou vrstev povrchově aktivní látky. Řetězce jsou k sobě orientovány tak, že polární skupiny směřují ven. V důsledku tvorby laminárních micel je možné u dostatečně koncentrovaných roztoků vytvořit gel [15].



Obr. 10: a) Model Hartleyovy ionogenní micely; b) válcovitá micela; c) hexagonální kapalně krystaly; d) schéma McBainových laminárních micel [15]

2.3.2 Kritická micelární koncentrace (CMC)

Asociativní povrchově aktivní látky při velkém zředění tvoří pravé roztoky. Koncentrace, při níž se v pravém roztoku micelárního koloidu začínají tvořit první micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). CMC různých látek kolísá v rozmezí 10^{-5} - 10^{-3} mol l^{-1} . Pod touto koncentrací je micelární koloid v systému pouze ve formě jednotlivých molekul. Nad hodnotou CMC jsou všechny další přidávané molekuly do roztoku asociovány do micel. CMC je tedy nejvyšší koncentrace, při níž je povrchově aktivní látka v molekulové formě v roztoku [15].

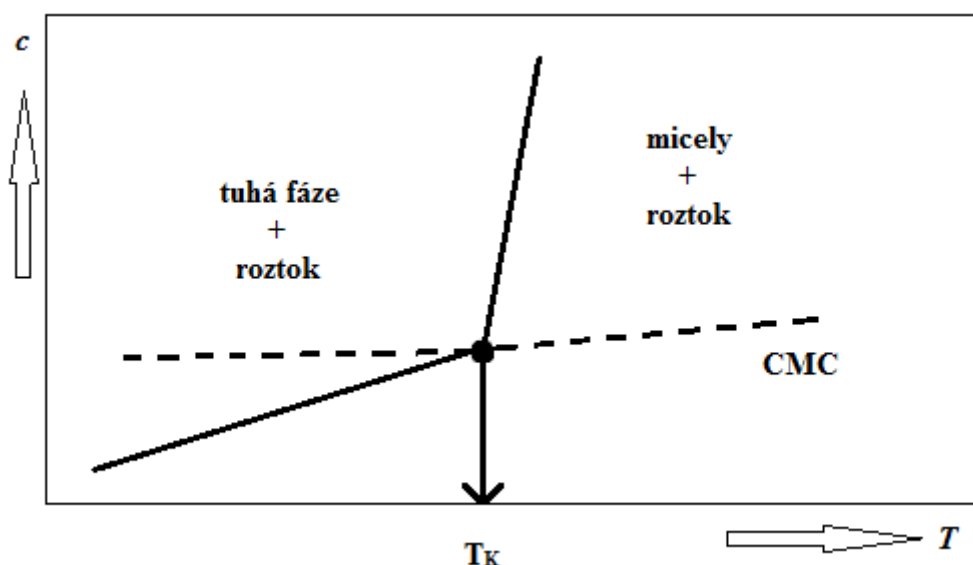
2.3.3 Faktory ovlivňující CMC

CMC závisí na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce. S rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce hodnota CMC klesá. Dále závisí na vlastnostech hydrofilní skupiny, na vlastnostech protiionů vzniklých disociací (CMC klesá se zvyšujícím se nábojem

protiontů), na přítomnosti dalších látek v roztoku. Je též závislá na tlaku, teplotě (s rostoucí teplotou se hodnota CMC může snižovat či zvyšovat, záleží na konkrétním systému a podmínkách) a vlastnostech rozpouštědla [15].

2.3.4 Krafftova teplota

Nezbytnou podmínkou ke vzniku micel je, aby teplota systému byla vyšší než tzv. Krafftova teplota (Krafftův bod). Na Obr. 11 je křivka závislosti pozorované rozpustnosti tenzidu na teplotě. Počátek tvorby agregátů se projeví zřetelným zlomem, který odpovídá Krafftově teplotě. Pokud je teplota menší než Krafftova, rozpustnost tenzidu ve vodě je nepatrná, zatímco nad touto teplotou pozorovaná rozpustnost tenzidu výrazně roste díky tvorbě agregátů (micel). V případě aplikací tenzidů se obvykle pracuje při teplotách vyšších než Krafftova, proto je nutnou podmínkou vzniku micel uváděno překročení hodnoty CMC. Krafftova teplota odráží rozdíly mezi energií tenzidu v krystalickém stavu a ve stavu agregátů v roztoku. Významně závisí na struktuře tenzidu (počet, délka a větvení hydrofobní části), a na přítomnosti dalších polárních segmentů.



Obr. 11: Závislost rozpustnosti tenzidů a kritické micelární koncentrace na teplotě, kde T_K je Krafftova teplota, plnou čarou je znázorněna rozpustnost a přerušovanou čarou CMC.

2.3.5 AgregáčnÍ číslo

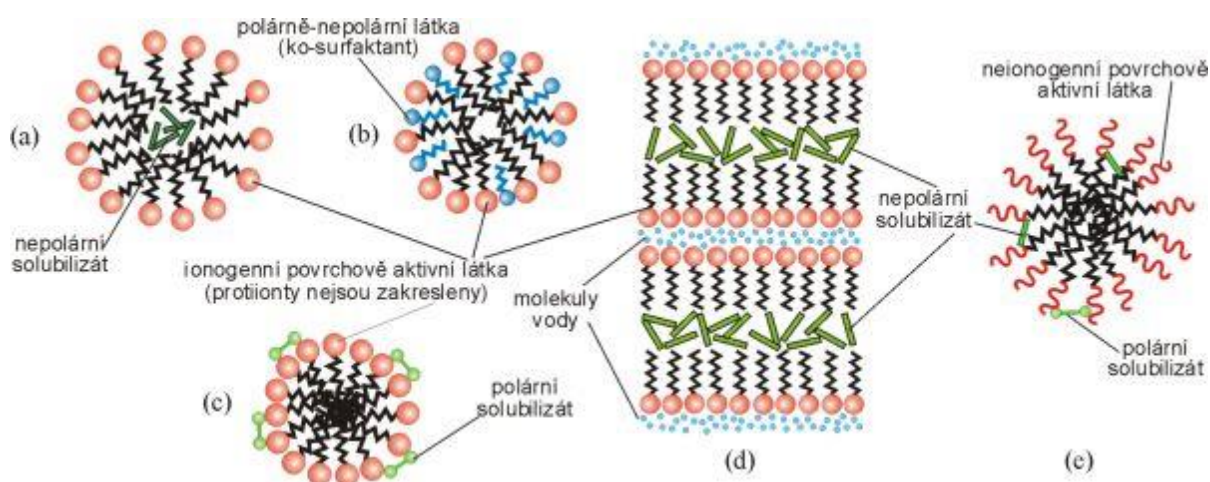
Agregační číslo udává počet molekul povrchově aktivní látky tvořící konkrétní strukturu micely. Je jedním z charakteristických znaků micely. AgregáčnÍ číslo roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá polární skupina. Plocha závisí nejen na velikosti polární skupiny, ale i na odpuzivých silách, které působí mezi sousedními polárními skupinami na povrchu. AgregáčnÍ číslo může být ovlivněno i teplotou. Čím je teplota vyšší, tím je agregáčnÍ číslo vyšší [17]. AgregáčnÍ číslo se určuje pomocí zhášení fluorescence díky fluorescenční sondě, která je zabudovaná do struktury micely [18].

2.3.6 Solubilizace

Jednou z významných vlastností asociativních koloidů je solubilizace. Úzce souvisí se strukturou micel. Je to schopnost rozpustit i látky, které jsou jinak v čistém disperzním

prostředí nerozpustné. Solubilizace probíhá jen tehdy, je-li překročena hodnota CMC. Solubilizace je proces, kdy jsou solubilizované látky začleňovány do micel. Podle molekulární struktury rozpouštěné látky se mechanismus solubilizace mění. Ve vodném prostředí se rozpouštějí uvnitř micel nepolární látky. Látky polárně-nepolárního charakteru (ko-surfaktanty) se začleňují do micely tak, že jejich polární skupiny směřují vně micely a nepolární skupiny dovnitř micely. Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely nebo v jeho těsné blízkosti (viz Obr. 12). Organické látky se v micelách laminárního typu solubilizují tak, že se rozmisťují mezi uhlovodíkové konce molekul PAL. Tímto se od sebe laminární vrstvy oddalují.

Během solubilizace roste hmotnost micel PAL a to nejen díky molekulám solubilizátu zabudovaných do micely, ale i kvůli tomu, že solubilizací se zvětšuje objem hydrofobního jádra a tím se tedy musí zvětšit i počet molekul PAL tvořících micelu [15].



Obr. 12: Způsoby solubilizace polárních, polárně-nepolárních a nepolárních látek v micelách tenzidu [15]

2.3.6.1 Solubilizační kapacita

Solubilizační kapacita označuje mol solubilizované látky na mol micel tenzidu, odpovídající stavu nasycení micel. V případech, kdy není možné určit solubilizační kapacitu, se určuje obecnější, solubilizační síla, která je definovaná jako mol solubilizované látky na mol tenzidu. Tato hodnota je vztažena na příslušné množství solubilizující látky při stavu nasycení micel.

2.4 UV-VIS absorpční spektrofotometrie

V molekulární absorpční spektrofotometrii je měřeno množství absorbovaného ultrafialového (UV) nebo viditelného (VIS) záření zředěnými roztoky molekul. Tato metoda zjišťuje, do jaké míry, a při kterých vlnových délkách roztok světlo pohlcuje [19].

2.4.1 Absorbance

Pokud na kyvetu obsahující roztok absorbující látky dopadá zářivý tok Φ_0 , pak prošlý zářivý tok Φ poklesne na nižší hodnotu. Pokles je zapříčiněn odražením, rozptýlením a absorpcí světla.

Absorbance je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmitance. Pokud roztok neabsorbuje žádné záření, je hodnota absorbance nulová, hodnota transmitance je naopak jednotková.

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (1)$$

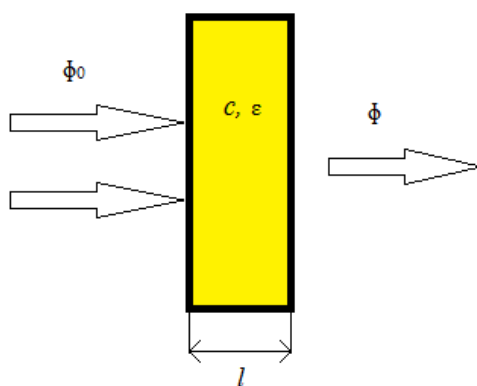
2.4.2 Lambert-Beerův zákon

Absorbance roztoku je přímo úměrná koncentraci absorbující látky ve vzorku a tloušťce absorbující vrstvy. Tato závislost se nazývá Lambert-Beerův zákon. Lze ho zapsat ve tvaru

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon_\lambda \quad (2)$$

kde c představuje látkovou koncentraci, l je tloušťka vrstvy a ε_λ je molární extinkční koeficient (Obr. 13). Extinkční koeficient je veličina charakteristická pro danou absorbující látku v daném prostředí a závisí na vlnové délce, při které je prováděno měření. Pokud je v roztoku více složek, které absorbují světlo, výsledná hodnota absorbance je dána součtem jednotlivých absorbancí [20].

Lambert-Beerův zákon je limitním zákonem, jelikož platí pouze za určitých podmínek. Platí pro zředěné roztoky do koncentrací přibližně 10^{-2} M, pro monochromatické záření a pro roztoky obsahující jen jednu složku schopnou absorbovat záření [21].



Obr. 13: Znáznornění absorpce při průchodu záření kyvetou se vzorkem

2.4.3 Absorpční křivky

Závislost absorbance na vlnové délce je znázorněna absorpční křivkou, která je kvalitativní charakteristikou látky či směsi látek. Absorpční křivky jsou ovlivňovány různými faktory. Prvním faktorem je teplota, jejíž vliv je patrný především ve zředěných roztocích, dále například iontová síla roztoku, díky které může být změněn tvar absorpční křivky. Působením rozpouštědla někdy dochází k bathochromnímu nebo hypsochromnímu efektu. U bathochromního efektu dochází k posunu vlnové délky absorpčního signálu směrem k větším vlnovým délkám a u hypsochromního efektu dochází k posunu opačným směrem. Vliv na absorpční spektra mají též tenzidy. Jejich přítomnost v roztoku způsobuje posun λ_{\max} a vzrůst molárního extinkčního koeficientu [22].

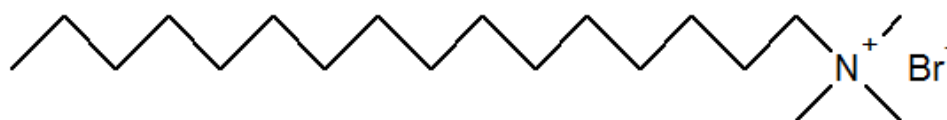
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Povrchově aktivní látky (tenzidy)

CTAB (Cetyltrimethylamonium bromid)

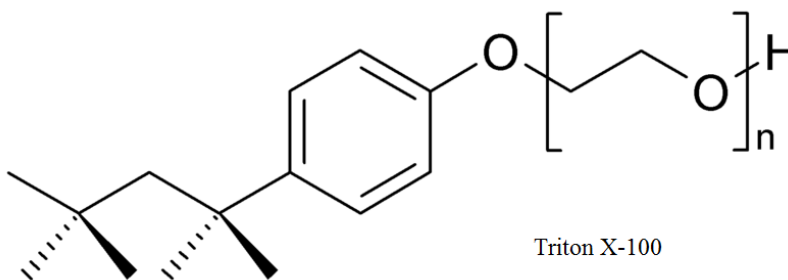
Sigma Aldrich, CAS: 57-09-0, Sigma, Ultra $\geq 99,0\%$, šarže 1000612441



CTAB - Cetyltrimethylamonium bromid

Triton X-100

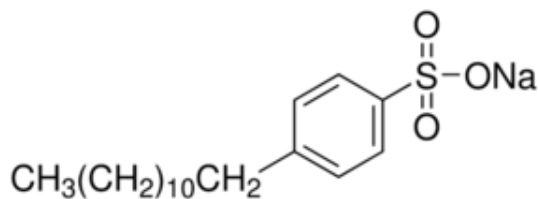
CAS: 9002-93-1, Fluka, BioChemika, šarže 93418



Triton X-100

SDBS (Sodium dodecylbenzenesulfonate)

Sigma Aldrich, CAS: 25155-30-0, Sigma, šarže 63179

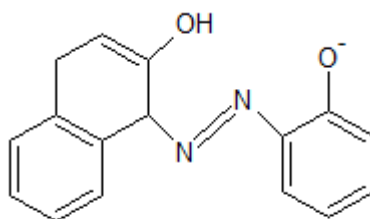


SDBS - Sodium dodecylbenzenesulfonate

Barviva (sondy)

Sudánová červeň (Sudan Red G)

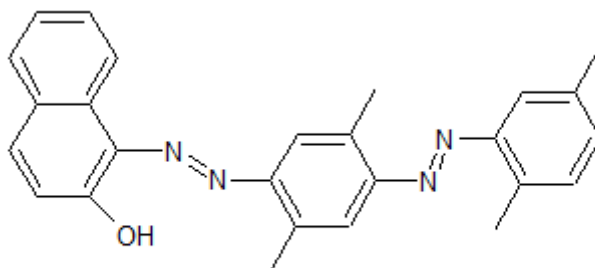
CAS: 1229-55-6, Fluka, šarže 17373



Sudánová červeň - Sudan Red G

Olejová červen (Oil Red O)

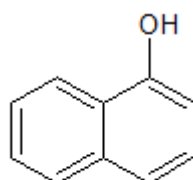
Sigma Aldrich, CAS: 1320-06-5, Sigma, šarže 1000759015



Oil Red O - olejová červen

1-naftol (α -naftol)

CAS: 90-15-3, Sigma Aldrich, čistota $\geq 99\%$, šarže 101256



1-naftol

Fosfolipidy

Lecithin

L- α -fosfatidylcholin, hydrogenated (Egg, Chicken), Avanti Polar Lipids, šarže: EPC-599

SonoVue[®]

BRACCO, 25 mg lyofilizovaného prášku + 5 ml fyziologického roztoku (0,15 M roztok NaCl), (Makrogol 4000, distearoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný, kyselina palmitová), šarže 11A029G

Rozpouštědla

Aceton

Penta, čistota 99,5 %, šarže 1212021209

NaCl (chlorid sodný)

Lachner s.r.o., CAS: 7647-14-5, čistota 99,5 %, šarže 30453

Mili-Q voda (Milipore Academic)

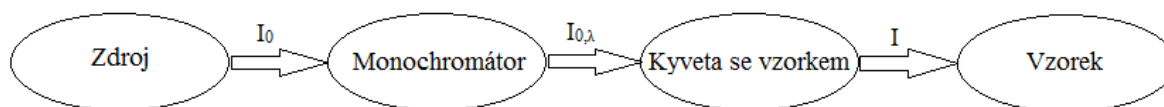
3.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy	Denver instrument
Automatické pipety	Biohit, Finnpiette, Vitrum
Magnetické míchadlo	Heidolph MR Hei-Standard
Třepačka	MS2 Minishaker
Odstředivá centrifuga	Rotofix 32
UV-VIS spektrofotometr	Cary Probe 50, Varian

- Cary Probe 50

Zdroj záření	xenonová pulzní lampa
Monochromátory	Czerny-Turner 0,25 m
Rozmezí λ	190 – 1100 nm
Opakovatelnost λ	$\pm 0,1$ nm
Maximální rychlost skenu	24 000 nm/min
Detektor	2 křemíkové diody

UV-VIS spektrofotometr je zařízení, které je používáno pro měření elektronových absorpčních spekter. Cary Probe 50 je spektrofotometr s jednopaprskovým uspořádáním skládající se ze zdroje záření, monochromátoru (získání záření o určité vlnové délce), kyvety se vzorkem a detektoru (Obr. 14).



Obr. 14: Schéma jednopaprskového UV-VIS spektrofotometru Cary probe 50

3.3 Příprava zásobních roztoků

3.3.1 Zásobní roztoky tenzidů

Nejprve byla navržena koncentrace všech tří tenzidů tak, aby byla alespoň o dva až tři řády vyšší než je jejich kritická micelární koncentrace ve fyziologickém roztoku. Důvodem bylo poskytnout v roztoku koncentraci micel vyšší než koncentrace později přítomného barviva. Takto byla zajištěna solubilizace maximálního množství barviva do micel tenzidů.

Pro přípravu zásobních roztoků bylo odváženo potřebné množství CTAB, SDBS a Tritonu X–100. Sypká látka byla rozpuštěna a dobře promíchána s fyziologickým roztokem (0,15 M roztok NaCl) a roztok byl v odměrné baňce doplněn na přesný objem. Triton X–100 je látka kapalná, potřebné množství proto bylo pipetováno na analytických vahách přímo do odměrné baňky a poté byl roztok taktéž doplněn na přesný objem. Koncentrace CTAB a Triton X–100 ve 100 ml fyziologického roztoku činila $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace SDBS ve 100 ml fyziologického roztoku byla poloviční, činila $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a to kvůli úplnému rozpuštění SDBS; potřebné množství navážky pro vytvoření koncentrace $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve 100 ml se v odměrné baňce nerozpustilo.

Zásobní roztoky byly skladovány v zásobních lahvích, ve tmě při laboratorní teplotě.

3.3.2 Zásobní roztok lecithinu

Zásobní roztok lecithinu byl předpřipraven předem a jeho koncentrace byla zvolena $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v Mili-Q vodě. Dále byly vytvořeny zásobní roztoky lecithinu o koncentracích $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ tak, že ze zásobního roztoku $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ byl odebrán potřebný objem k získání nové koncentrace a tento objem byl doplněn Mili-Q vodou do celkového objemu 15 ml.

3.3.3 Zásobní roztoky hydrofobních solutů

Koncentrace zásobních roztoků Sudanu Red G, Oil Red O a 1-naftolu v acetonu byla zvolena na $5 \cdot 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Sypké látky byly rozpuštěny v acetonu a roztoky byly v odměrných baňkách doplněny na přesný objem a řádně promíchány. Skladovány byly poté po celou dobu v lednici.

3.4 Příprava vzorků

3.4.1 Vzorky k zjištění molárních extinkčních koeficientů solutů v tenzidech a v lecithinu

Ze zásobního roztoku Sudanu Red G v acetonu bylo pipetováno 0,8; 1; 2 a 3 ml do suchých čistých vialek. Konečná koncentrace Sudanu Red G v 5 ml vzorku tedy činila $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z vialek byl v digestoři odpařen veškerý aceton. Poté bylo přidáno 5 ml ze zásobního roztoku CTAB ke každé koncentraci Sudanu Red G. Do dalších čtyř vialek s koncentrační řadou Sudanu Red G bylo přidáno po 5 ml SDBS a do dalších čtyř po 5 ml Tritonu X-100. Z každé ze čtyř vybraných koncentrací Sudanu Red G s tenzidem byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky (celkem tedy 36 vzorků). U každého vzorku byla změřena absorbance potřebná pro výpočet molárního extinkčního koeficientu. Totožně byly připraveny vzorky s Oil Red O a s 1-naftolem.

Pro zjištění molárního extinkčního koeficientu solutů v lecithinu byly vzorky připraveny obdobně jako vzorky s tenzidy. Do vialek bylo napipetováno 0,8; 1; 2 a 3 ml Sudanu Red G v acetonu, do dalších čtyř vialek 0,8; 1; 2 a 3 ml Oil Red O v acetonu a do dalších 0,8; 1; 2 a 3 ml 1-naftolu v acetonu. Z vialek byl v digestoři odpařen veškerý aceton a poté bylo přidáno do každé vialky 5 ml ze zásobního roztoku lecithinu o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Z každé ze čtyř vybraných koncentrací solutů s lecithinem byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky.

3.4.2 Vzorky pro výpočet koncentrace solutů solubilizovaných v micelách tenzidů

Byla vytvořena koncentrační řada tenzidů tvořená čtyřmi koncentracemi. Ze zásobních roztoků byly pipetovány potřebné objemy. Napipetované objemy byly doplněny fyziologickým roztokem na celkový objem 10 ml. Do prázdných čistých vialek bylo vsypáno velice malé množství, několik zrněk barviva (Sudan Red G, Oil Red O, 1-naftol), které bylo zalito právě připravenými 10 ml zředěných tenzidů. Od každé koncentrace tenzidu byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky. Vzorky byly ponechány do dalšího dne na třepače. Před vlastním měřením byly vzorky centrifugovány po dobu deseti minut při otáčkách 40 000 za minutu.

3.4.3 Vzorky pro výpočet koncentrace solutů solubilizovaných v lecithinu

Do prázdných čistých vialek bylo vsypáno malé množství barviva (Sudan Red G, Oil Red O, 1-naftol), které bylo zalito 5 ml lecithinu o koncentracích 10, 50, 100 a 1000 mg·l⁻¹. Od každé koncentrace lecithinu byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky. Vzorky byly ponechány do dalšího dne na třepačce. Před vlastním měřením byly vzorky centrifugovány po dobu deseti minut při otáčkách 40 000 za minutu.

3.5 Metoda měření

3.5.1 UV-VIS Spektrofotometrie

Ve všech případech byly vialky zavičkovány a před vlastním měřením ponechány protřepávat do dalšího dne. Příští den byly sejmuty z třepačky a bylo provedeno jejich měření na UV-VIS spektrofotometru VARIAN Cary 50 Probe. Měření bylo prováděno za laboratorní teploty.

U vzorků byla měřena absorbance. Rozsah vlnových délek byl nastaven vždy podle měřeného solutu (barviva). U Sudanu Red G byl rozsah zvolen od 400 nm do 600 nm, u Oil Red O také od 400 do 600 nm a u 1-naftolu od 200 do 400 nm. Jako slepý vzorek (blank) byl zvolen příslušný tenzid ve fyziologickém roztoku, lecithin v Mili-Q vodě a přípravek SonoVue[®] bez přidaných barviv.

3.6 Standardní vyhodnocení dat

3.6.1 Zjištění molárního extinkčního koeficientu solutů v tenzidech a v lecithinu

Byla vybrána nejvyšší hodnota absorbance ve zvoleném rozsahu vlnových délek. Pomocí Lambert-Beerova zákona byl početně zjištěn molární extinkční koeficient příslušného solutu ve vybraném tenzidu a v lecithinu jako podíl absorbance a hodnoty předem zvolené koncentrace barviva.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \Rightarrow \varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad (3)$$

Vypočtené extinkční koeficienty u každé koncentrace byly zprůměrovány ze tří měření a byla zjištěna jejich směrodatná odchylka.

3.6.2 Zjištění koncentrace solutů uvnitř micel tenzidů, v lecithinu a v SonoVue[®]

U namíchaných vzorků byla měřena absorbance. Byla vybrána nejvyšší hodnota absorbance ve zvoleném rozsahu vlnových délek. Některé vzorky byly příliš koncentrované, hodnota absorbance byla vyšší než 1,5, a proto musely být zředěny. Ředění se pak odrazilo ve výpočtu koncentrace. Pomocí Lambert-Beerova zákona a získaných molárních extinkčních koeficientů byla zjištěna koncentrace solutů solubilizovaných uvnitř micel tenzidů, v lecithinu a v SonoVue[®].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \Rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (4)$$

Vypočtené koncentrace solutů byly zprůměrovány vždy ze tří vzorků a byla zjištěna jejich směrodatná odchylka.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Molární extinkční koeficient solutů v tenzidech a v lecithinu

4.1.1 CTAB

Tab. 2: Molární extinkční koeficient Sudanu Red G v CTAB

CTAB [mM]	Sudan Red G [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	48 018	1197
	0,01	44 076	805
	0,02	42 683	256
	0,03	43 950	304

Tab. 3: Molární extinkční koeficient Oil Red O v CTAB

CTAB [mM]	Oil Red O [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	30 281	458
	0,01	29 259	616
	0,02	27 974	1 547
	0,03	26 144	232

Tab. 4: Molární extinkční koeficient 1-naftolu v CTAB

CTAB [mM]	1-naftol [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	-	-
	0,01	16 012	950
	0,02	9 765	4 333
	0,03	18 605	3 965

Koncentrace CTAB byla zvolena 100 mM a tím bylo zajištěno, že byly veškeré hydrofobní soluty naší zvolené koncentrační řady solubilizovány uvnitř micel a my tak mohli změřit na UV-VIS spektrofotometru potřebnou absorbanci solutů právě uvnitř micel CTAB. V případě Sudanu Red G a Oil Red O během měření nevznikaly žádné problémy. Z absorpčního maxima při 518 nm (SRG) a 521 nm (ORO) byla odečtena hodnota absorbance a stanoven molární extinkční koeficient na $44\,682 \pm 641 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro Sudan Red G a $28\,415 \pm 714 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro Oil Red O v CTAB.

Při měření 1-naftolu vznikl problém v tom, že při koncentraci $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla hodnota absorbance nižší než 0,1. Z tohoto důvodu nebyly vypočtené hodnoty extinkčních koeficientů (pro $A < 0,1$) zařazeny do konečného průměru. Extinkční koeficient 1-naftolu v CTAB byl stanoven na $14\,023 \pm 3\,083 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Molární extinkční koeficienty jsou výsledkem

průměru vypočteného vždy ze tří proměřovaných vzorků a to i pro všechny následující případy.

4.1.2 SDBS

Tab. 5: Molární extinkční koeficient Sudanu Red G v SDBS

SDBS [mM]	Sudan Red G [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
50	0,008	43 175	1 066
	0,01	43 060	726
	0,02	43 428	510
	0,03	44 088	490

Tab. 6: Molární extinkční koeficient Oil Red O v SDBS

SDBS [mM]	Oil Red O [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
50	0,008	30 003	904
	0,01	30 333	1 291
	0,02	31 119	794
	0,03	32 172	393

Tab. 7: Molární extinkční koeficient 1-naftolu v SDBS

SDBS [mM]	1-naftol [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
50	0,008	-	-
	0,01	-	-
	0,02	15 095	6 369
	0,03	12 203	4 737

Jak je zmíněno výše, koncentrace SDBS byla zvolena na 50 mM, protože se potřebná navážka pro koncentraci 100 mM v odměrné baňce 100 ml nerozpustila. To ale ničemu nevadilo, protože byly koncentrace zvolené tak, aby se hydrofobní soluty plně solubilizovaly v micelách SDBS. Tak jako u CTAB byly k výpočtu použity absorpční maxima jednotlivých solutů. Molární extinkční koeficient Sudanu Red G v SDBS byl stanoven na $43\,438 \pm 698$ dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. Extinkční koeficient Oil Red O v SDBS byl stanoven na $30\,907 \pm 845$ dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. U 1-naftolu byly k výpočtu použity jen hodnoty absorbancí vyšší než 0,1. Nižší absorbance nebyly do výpočtu zařazeny a nejsou ani zobrazeny v tabulce. Extinkční koeficient 1-naftolu v SDBS byl stanoven na $13\,649 \pm 1\,446$ dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. Vzhledem k tomu, že většina absorbancí byla nižší než 0,1, je hodnota extinkčního koeficientu 1-naftolu v roztoku SDBS zatížena chybou.

4.1.3 Triton X-100

Tab. 8: Molární extinkční koeficient Sudanu Red G v Tritonu X-100

Triton X-100 [mM]	Sudan Red G [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	40 091	1 462
	0,01	39 312	865
	0,02	38 882	611
	0,03	41 378	992

Tab. 9: Molární extinkční koeficient Oil Red O v Tritonu X-100

Triton X-100 [mM]	Oil Red O [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	29 059	237
	0,01	29 281	101
	0,02	30 610	233
	0,03	30 764	624

Tab. 10: Molární extinkční koeficient 1-naftolu v Tritonu X-100

Triton X-100 [mM]	1-naftol [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	-	-
	0,01	-	-
	0,02	3 334	108
	0,03	3 269	264

Molární extinkční koeficient Sudanu Red G v Tritonu X-100 byl stanoven na hodnotu $39\,916 \pm 983 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Pro Oil Red O byl molární extinkční koeficient stanoven na $29\,929 \pm 298 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Při měření absorbancí 1-naftolu docházelo při koncentraci $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ opět k situaci, kdy hodnoty absorbance byly nižší než 0,1, a proto nebyly tyto hodnoty zařazeny do výpočtu. Molární extinkční koeficient 1-naftolu v Tritonu X-100 byl stanoven na $3\,302 \pm 78 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.1.4 Lecithin

Tab. 11: Molární extinkční koeficient Sudanu Red G v lecithinu

Lecithin [mg·l ⁻¹]	Sudan Red G [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	28 070	1 177
	0,01	28 774	744
	0,02	30 147	1 398
	0,03	25 822	320

Tab. 12: Molární extinkční koeficient Oil Red O v lecithinu

Lecithin [mg·l ⁻¹]	Oil Red O [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	13 001	564
	0,01	11 826	427
	0,02	14 698	651
	0,03	18 669	33

Tab. 13: Molární extinkční koeficient 1-naftolu v lecithinu

Lecithin [mg·l ⁻¹]	1-naftol [mM]	průměr ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	odchylka ϵ
100	0,008	12 392	326
	0,01	9 539	605
	0,02	18 892	110
	0,03	43 193	656

Koncentrace lecithinu 100 mg·l⁻¹ byla zvolena proto, aby se hydrofobní soluty různé koncentrace solubilizovaly do vytvořených micel lecithinu, nejlépe úplně. Molární extinkční koeficient Sudanu Red G v lecithinu byl stanoven na hodnotu 28 203±910 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. Koeficient Oil Red O v lecithinu byl stanoven na 14 549±419 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. Při měření 1-naftolu nebyla do výsledného průměru zařazena hodnota extinkčního koeficientu při koncentraci 0,03 mM, protože hodnota absorbance ve vzorku přesahovala hodnotu 1,0. Výsledný průměr byl tedy získán z hodnot prvních tří koeficientů. Molární extinkční koeficient 1-naftolu byl stanoven na hodnotu 13 608±347 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹.

Získané molární extinkční koeficienty hydrofobních solutů v lecithinu byly později použity pro výpočet koncentrace solutů solubilizovaných v Sonovue®.

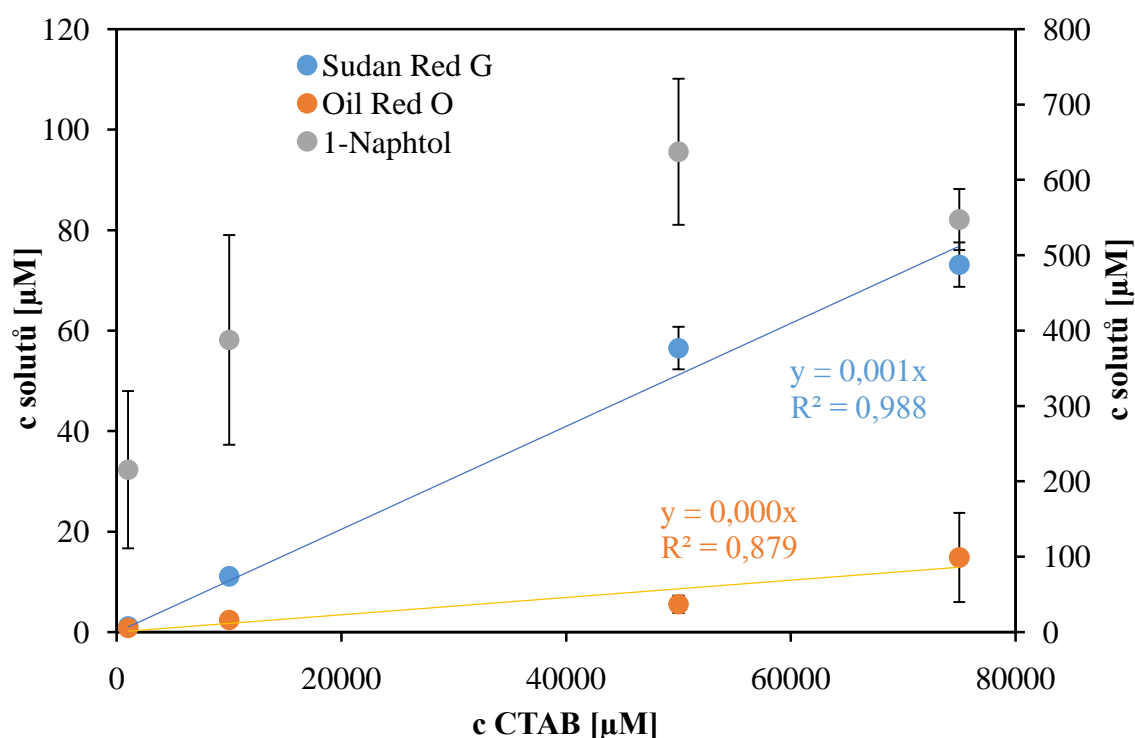
4.2 Koncentrace solutů solubilizovaných uvnitř micel tenzidů, v lecithinu a v SonoVue®

4.2.1 Solubilizační schopnosti CTAB, SDBS a Tritonu X-100

Obr. 15, Obr. 16 a Obr. 17 zobrazují závislost koncentrací hydrofobních solutů na koncentraci tenzidů v prostředí fyziologického roztoku. Koncentrace 1-naftolu je vždy vynesena na vedlejší ose kvůli lepší přehlednosti a orientaci v grafech.

Obr. 15 zobrazuje koncentraci solutů v CTAB. Koncentrace Sudanu Red G (SRG) je lineárně rostoucí s rostoucí koncentrací CTAB. Hodnota solubilizovaného SRG při koncentraci CTAB 1 mM je zatížena chybou, protože hodnota absorbance roztoku byla nižší než 0,1, avšak do grafu jsme tuto hodnotu zařadili. Při měření SRG jsme u koncentrací CTAB 50 a 75 mM museli vzorky desetkrát ředit z důvodu absorbance roztoku vyšší než 1, což se poté projevilo ve výpočtu vynásobením výsledné koncentrace právě touto hodnotou ředění. Koncentrace SRG byla v 75 mM roztoku CTAB 73,13 µM. Koncentrace Oil Red O (ORO) lineárně rostoucího charakteru jak lze vidět z grafu není, o čemž vypovídá i hodnota spolehlivosti. Oproti SRG se ORO solubilizoval v CTAB méně. To je způsobeno tím,

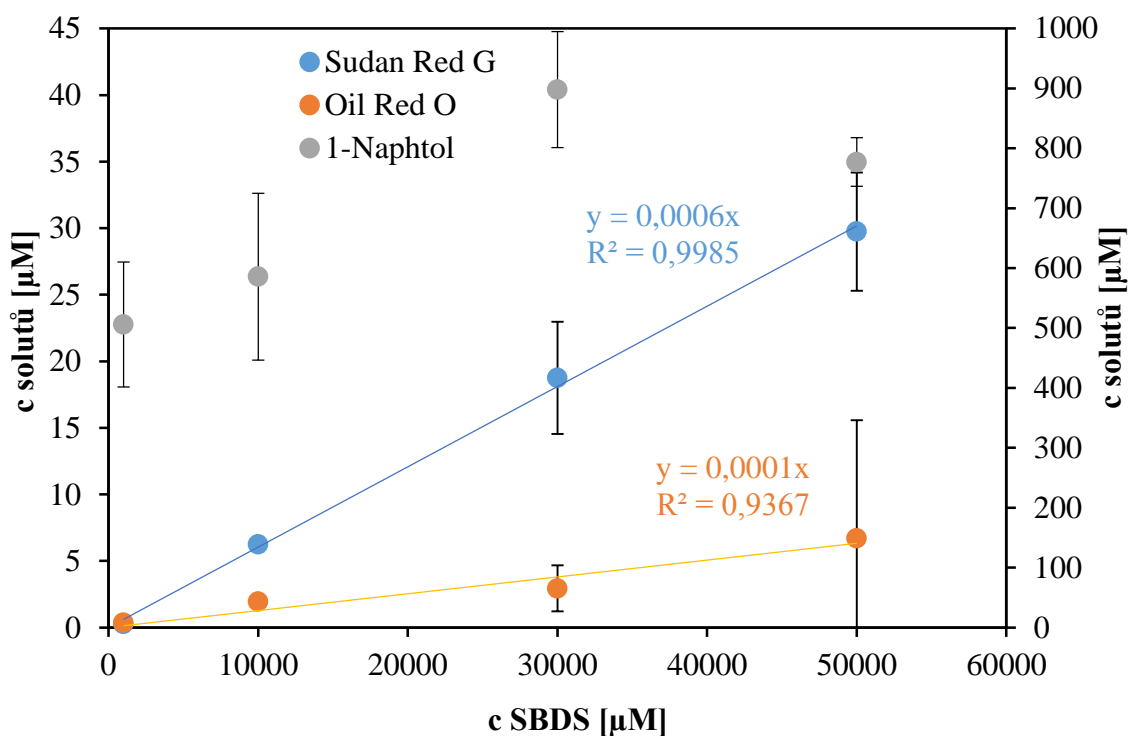
že ORO je poměrně velká molekula (bis-diazo) zatímco SRG asi poloviční (diazo), a proto se do micel CTAB solubilizuje ORO v menším počtu molekul. Vzorky s ORO v CTAB jsme ředit nemuseli. ORO v 1 mM roztoku CTAB vykazuje chybu, vzorky sice absorbovaly určitou část záření, tudíž se v micelách tenzidů nějaká koncentrace barviva solubilizovala, ale hodnota absorbance nedosahovala hodnoty alespoň 0,1, a proto se v budoucnu s těmito koncentracemi nedá počítat. Možností je provést tento experiment ještě jednou. V 75 mM roztoku CTAB se solubilizovalo 14,85 μM ORO. 1-naftol se v roztoku CTAB solubilizoval ze všech tří solutů nejvíce. Důvodem bylo to, že je jeho molekula menší, a proto jsou utvořené micely schopny pojmout větší počet molekul. Jak můžeme vidět v grafu, hodnotám 1-naftolu nebyl přidělen žádný specifický trend, nejvíce se však podobá trendu logaritmickému. Všechny proměřované vzorky musely být desetkrát zředěny, při výpočtu pak byla výsledná koncentrace vynásobena právě hodnotou ředění. Největší koncentraci měl 1-naftol v 50 mM roztoku CTAB, konkrétně 637,4 μM . Teoreticky by měla být koncentrace 1-naftolu největší v 75 mM roztoku CTAB, zde ale vidíme, že tomu tak není. Při vyšších koncentracích nejspíše dochází k saturaci micel CTAB 1-naftolem.



Obr. 15: Závislost koncentrace solubilizovaných solutů na koncentraci CTAB

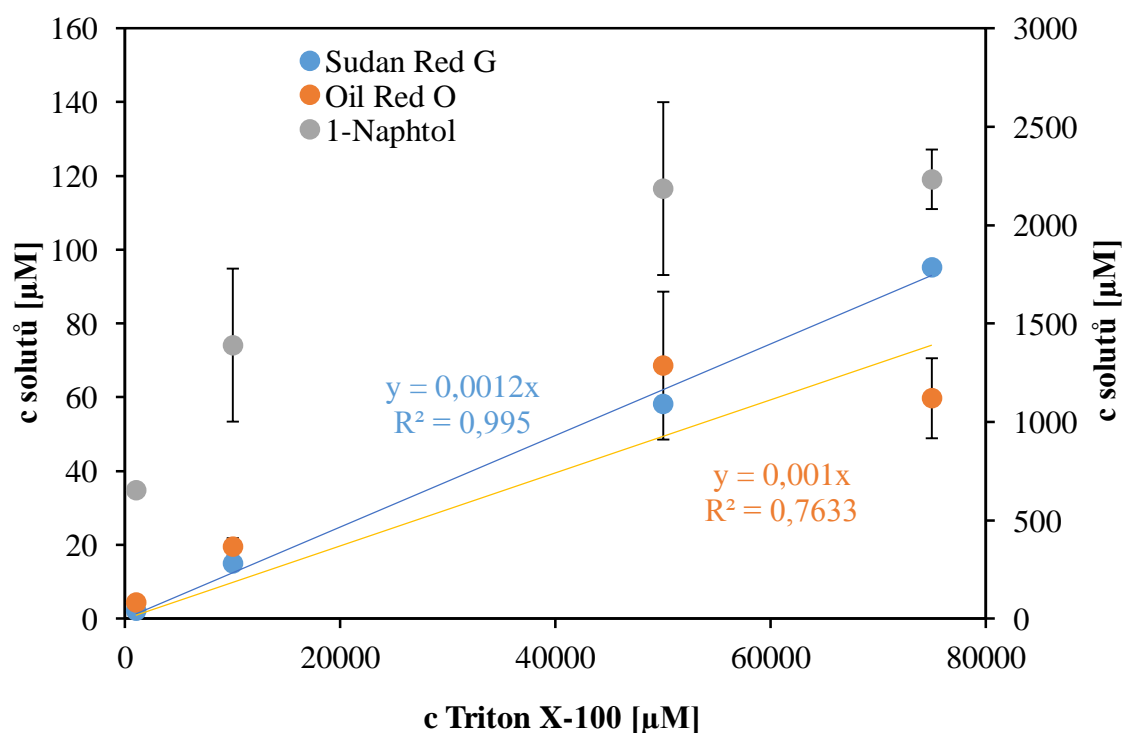
Obr. 16 zobrazuje koncentraci solutů v roztoku SDBS. Křivka SRG má opět lineárně rostoucí trend. Hodnoty absorbancí vzorků SRG v 1 mM roztoku SDBS byly v řádu setin, proto s nimi nemůžeme v budoucnu počítat. V 50 mM roztoku SDBS činila koncentrace solubilizovaného SRG 29,74 μM . To je téměř o polovinu méně než v 50 mM roztoku CTAB, což může být způsobeno tím, že má CTAB o čtyři $-\text{CH}_2-$ skupiny delší nepolární řetězec, při vytvoření micely je tedy její vnitřní prostor větší a přístupnější většímu počtu molekul. Křivka ORO má v roztoku SDBS lineárně rostoucí charakter, absorbance v 1 mM roztoku ale opět dosahovaly hodnot maximálně setin. Vzorky jsme ředit nemuseli. V 50 mM roztoku

SDBS činila koncentrace solubilizovaného ORO 6,69 μM , což je srovnatelné s hodnotou koncentrace v 50 mM roztoku CTAB. Jak můžeme z grafu vyčíst, 1-naftol se solubilizoval v micelách SDBS nejvíce. Všechny měřené vzorky musely být desetkrát zředěny. Konkrétní hodnota nejvyšší koncentrace je v 30 mM roztoku SDBS 898,01 μM . To je téměř o 400 μM více než v CTAB. Teoreticky by měla být koncentrace 1-naftolu největší v 50 mM roztoku CTAB, z grafu ale vidíme, že tomu tak není. Při vyšších koncentracích dochází opět k saturaci micel SDBS.



Obr. 16: Závislost koncentrace solubilizovaných solutů na koncentraci SDBS

Obr. 17 zobrazuje koncentraci solutů solubilizovaných v Tritonu X-100. Křivka SRG má lineárně rostoucí trend stejně jako v předchozích dvou případech. Při měření SRG jsme u koncentrací Tritonu 50 a 75 mM museli vzorky desetkrát zředit, hodnota absorbance roztoků byla vyšší než 1. Koncentrace SRG byla v 75 mM roztoku Tritonu X-100 95,30 μM , tedy nejvyšší ve vybraných třech tensidech. Koncentrace ORO lineárně roste s rostoucí koncentrací Tritonu X-100, ale pouze do hodnoty Tritonu 50 mM, poté koncentrace ORO klesá. Důvodem může být již zmíněná saturace tak jako u 1-naftolu. Při měření jsme u koncentrací Tritonu 50 a 75 mM s ORO museli vzorky čtyřikrát zředit. Výsledná koncentrace ORO v 50 mM roztoku Tritonu X-100 činí 68,69 μM . 1-naftol se v micelách Tritonu X-100 solubilizoval nejvíce a zároveň nejvíce ve všech třech tensidech, kde byl proměřován. Všechny měřené vzorky musely být desetkrát zředěny kvůli vysoké hodnotě absorbance roztoků. V 75 mM roztoku Tritonu X-100 se solubilizovalo 2233,6 μM 1-naftolu, což je asi čtyřikrát více než v CTAB a dva a půlkrát více než v SDBS. Z grafu nelze vyčíst, zda-li dochází k saturaci.

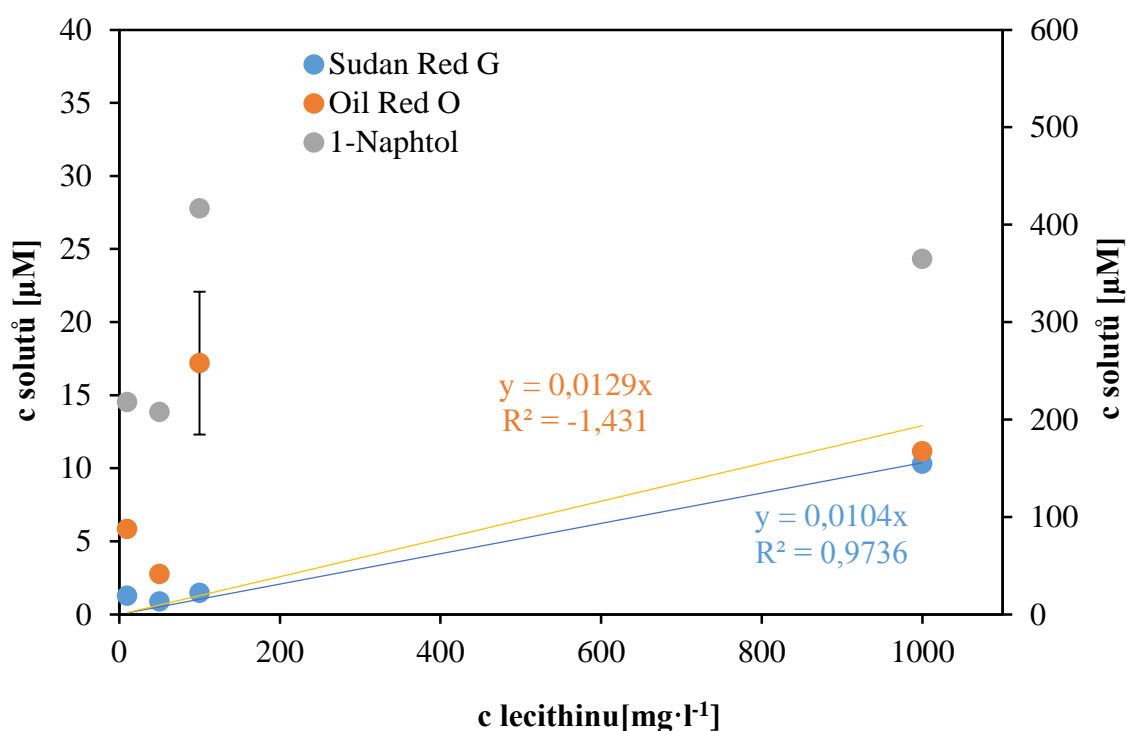


Obr. 17: Závislost koncentrace solubilizovaných solutů na koncentraci Tritonu X-100

4.2.2 Solubilizační schopnosti Lecithinu a SonoVue®

Obr. 18, Obr. 19 a Obr. 20 zobrazují závislost koncentrací hydrofobních solutů na koncentraci fosfolipidů. Lecithin je v prostředí deionizované mili-Q vody, SonoVue® naopak v prostředí fyziologického roztoku. Koncentrace 1-naftolu je ve všech třech grafech vynesena na vedlejší ose, opět kvůli lepší přehlednosti a orientaci.

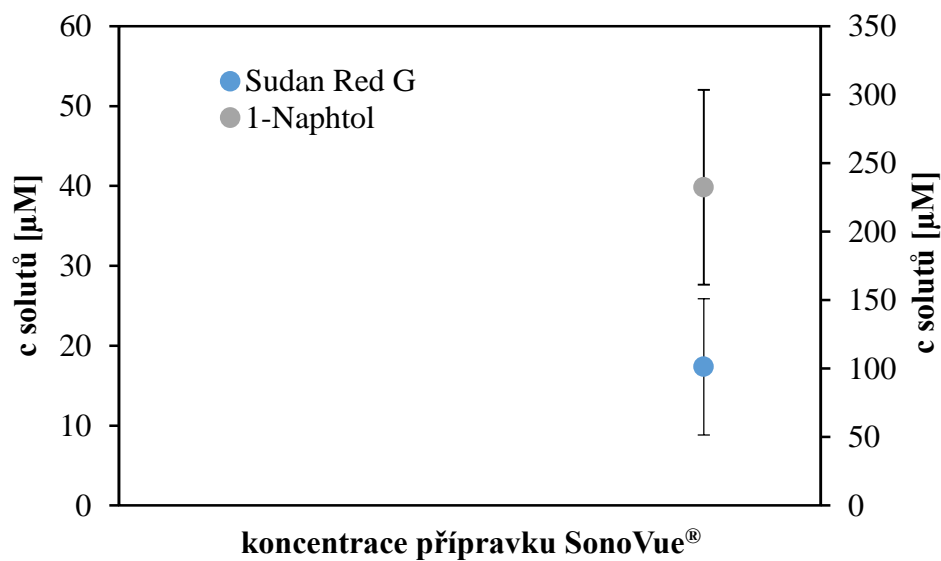
Obr. 18 zobrazuje koncentraci solutů solubilizovaných uvnitř lecithinu. Jde vidět, že SRG má stále lineárně rostoucí trend, jako měl i u tenzidů. Hodnoty absorbancí vzorků SRG v 10, 50 a 100 mg·l⁻¹ roztoku lecithinu byly v řádu setin, proto s nimi nemůžeme v budoucnu počítat, do grafu ale přesto byly pro přehled zařazeny. Při měření jsme žádný ze vzorků se SRG nemuseli podrobit ředění. Koncentrace SRG v 1000 mg·l⁻¹ roztoku lecithinu činila 10,31 μM. Koncentrace ORO je krajně nelineární, viz hodnota spolehlivosti. Hodnoty absorbancí vzorků ORO v 10 a 50 mg·l⁻¹ roztoku lecithinu byly menší než 0,1, proto s nimi nemůžeme v budoucnu dále počítat, do grafu ale byly pro přehled také zařazeny. K saturaci zde pravděpodobně dochází mezi koncentracemi 100 až 1000 mg·l⁻¹. Ani při měření vzorků s ORO jsme nemuseli ředit. Nejvyšší koncentrace byla v 100 mg·l⁻¹ lecithinu, konkrétně pak 17,19 μM. Při měření 1-naftolu jsme však ředit museli. Vzorek 1-naftolu s 10 mg·l⁻¹ jsme ředili čtyřikrát, ostatní tři koncentrace lecithinu s 1-naftolem byly zředěny pětkrát. Teoreticky by měla být koncentrace solubilizovaného 1-naftolu největší v 1000 mg·l⁻¹ lecithinu, největší je ale ve 100 mg·l⁻¹ lecithinu, pravděpodobně dochází opět k plnému nasycení micel lecithinu. Koncentrace 1-naftolu ve 100 mg·l⁻¹ činila 416,68 μM.



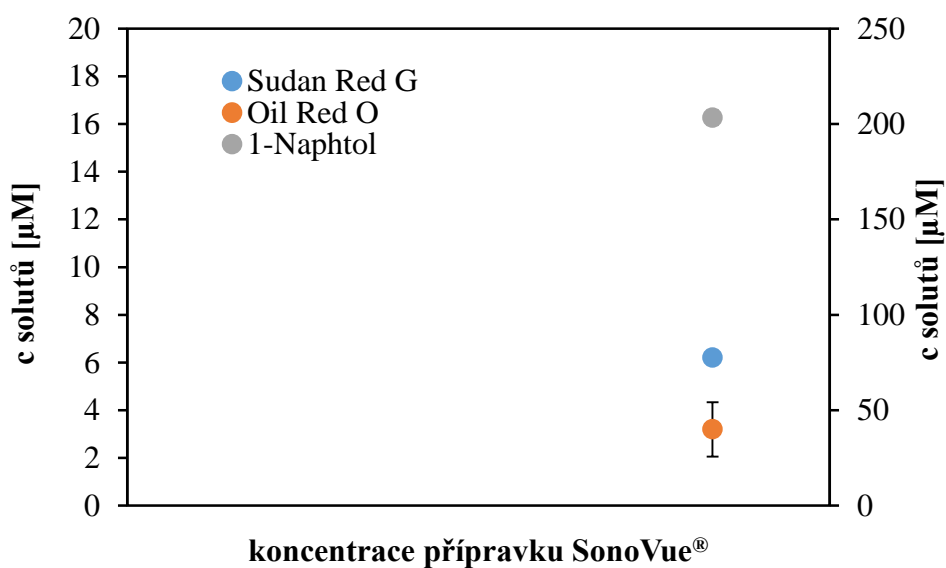
Obr. 18: Závislost koncentrace solubilizovaných solutů na koncentraci lecithinu

Obr. 19 zobrazuje koncentraci solutů solubilizovaných v přípravku SonoVue[®], která byla měřena hned druhý den po přípravě vzorků, tedy po 24 hodinách na třepačce. Jak můžeme vidět v grafu, v SonoVue[®] se nesolubilizoval ORO. Absorbance všech tří proměřovaných vzorků totiž nabývaly záporných hodnot v řádu setin. Může to být způsobeno tím, že je molekula ORO poněkud větší (bis-diazo molekula) a 24 hodin nestačilo k tomu, aby se ORO solubilizoval v mikrobublinách SonoVue[®]. Další možnost je ta, že slepý vzorek absorboval více záření než vzorek proměřovaný, avšak ve vzorcích jsme žádný vznik agregátů nezpozorovali. První vzorek SonoVue[®] se SRG měl taktéž zápornou hodnotu absorbance. Další dva vzorky však ne, a proto jsme mohli solubilizovanou koncentraci výpočítat. Koncentrace SRG v SonoVue[®] po 24 hodinách činila $17,36 \pm 8,54 \mu\text{M}$. Vzorky s 1-naftolem musely být pětkrát zředěny, aby byla hodnota absorbance vzorků v rozmezí 0,1 až 0,9. Koncentrace 1-naftolu v SonoVue[®] po 24 hodinách činila $232,30 \pm 71,15 \mu\text{M}$. V porovnání s lecithinem se v SonoVue[®] solubilizovalo téměř dvakrát méně 1-naftolu.

Obr. 20 zobrazuje koncentraci solutů solubilizovaných v přípravku SonoVue[®], která byla měřena až třetí den po přípravě vzorků, tedy po 78 hodinách kdy byly vzorky umístěny na třepačku. Oproti prvnímu měření (po 24 hodinách) můžeme vidět, že se již nějaká koncentrace ORO v SonoVue[®] nachází. Tato koncentrace byla získána z absorbancí vzorků přibližně okolo hodnoty 0,05. Jak můžeme vidět z grafu, množství solubilizovaného SRG v SonoVue[®] kleslo na hodnotu $6,20 \pm 3,00 \mu\text{M}$. V případě 1-naftolu proběhl také pokles koncentrace a to na hodnotu $203,38 \pm 3,68 \mu\text{M}$.



Obr. 19: Závislost koncentrace solubilizovaných solutů na koncentraci přípravku SonoVue®, měřeno po 24 hodinách na třepačce



Obr. 20: Závislost koncentrace solubilizovaných solutů na koncentraci přípravku SonoVue®, měřeno po 78 hodinách na třepačce

Výsledky jsou si v rámci chyby díky směrodatným odchylkám podobné, z čehož se dá usoudit, že při měření po 78 hodinách oproti měření po 24 hodinách nejspíše k navýšení ani úbytku koncentrace solutů nedošlo, kromě zmíněného ORO.

5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo studovat systémy založené na fosfolipidech pro sonografické aplikace, shromáždit literární poznatky o těchto systémech, dále navrhnout, provést a zhodnotit základní experimenty týkající se solubilizačních schopností zmíněných systémů. Shromážděné literární poznatky jsou součástí teoretické části.

Systémy byly zkoumány pomocí UV-VIS spektrofotometrie s využitím hydrofobních solutů Sudanu Red G, Oil Red O a 1-naftolu. Pro bližší zkoumání systémů byly vybrány tři druhy tenzidů a dva fosfolipidy. Kationaktivní tenzid CTAB, anionaktivní tenzid SDBS a neionogenní tenzid Triton X-100. Za zástupce fosfolipidů byly vybrány lecithin a komerčně dostupný přípravek SonoVue®.

Nejprve byla zjišťována hodnota molárních extinkčních koeficientů hydrofobních solutů v každém ze zmíněných systémů krom SonoVue®, pro který byly použity vypočtené molární extinkční koeficienty solutů v lecithinu. Systémy CTAB, SDBS a Triton X-100 byly studovány v prostředí fyziologického roztoku (roztok NaCl o koncentraci 0,15 M). Systémy lecithin a SonoVue® byly studovány ve vodě (Mili-Q). Vzorky byly namíchány tak, aby byla koncentrace tenzidů a lecithinu konstantní, a aby bylo dosaženo rostoucí koncentrace solutů. Při vlastním měření byl sledován růst hodnot absorbancí s rostoucí koncentrací hydrofobních solutů. Z hodnot absorbancí při vlnové délce λ_{\max} byly vypočítány molární extinkční koeficienty solutů jako průměr ze tří měření a byla zjištěna směrodatná odchylka.

V další části byly studovány solubilizační schopnosti zmíněných systémů a to tak, že byla zjišťována koncentrace hydrofobních solutů solubilizovaných uvnitř micel tenzidů, lecithinu a v mikrobublinách SonoVue®. Vzorky byly namíchány tak, že koncentrace tenzidů a lecithinu měla rostoucí charakter, koncentrace SonoVue® byla ve všech vzorcích stejná. Do každého vzorku byl přidán nadbytek hydrofobního solutu. Výsledné koncentrace solubilizovaných hydrofobních solutů v každém systému jsou průměrem ze tří měření. Ve všech zmíněných systémech se nejvíce solubilizoval 1-naftol. Důvodem je to, že je jeho molekula oproti Sudanu Red G a Oil Red O podstatně menší. Při vyšších koncentracích tenzidů a lecithinu docházelo k saturaci (nasycení) micel 1-naftolem. K saturaci též došlo u Oil Red O v 75 mM roztoku Tritonu X-100. Dále s rostoucí koncentrací tenzidů a lecithinu roste koncentrace solubilizovaného Sudanu Red G a Oil Red O. Při zkoumání solubilizačních schopností SonoVue® se při prvním měření, po 24 hodinách, uvnitř mikrobublin nesolubilizoval Oil Red O, nýbrž jen Sudan Red G a 1-naftol. Vyčkali jsme a po 78 hodinách jsme měření zkusili provést znovu. Určitá koncentrace Oil Red O se již v mikrobublinách SonoVue® solubilizovala, tuto hodnotu však nemůžeme v dalších experimentech použít, protože byla absorbance vzorků menší než 0,1. Oil Red O je prostornější molekula a do mikrobublin SonoVue® se dostává poněkud hůře. O Sudanu Red G a 1-naftolu můžeme díky chybovým úsečkám říci, že se jejich koncentrace uvnitř mikrobublin po 78 hodinách téměř neliší od výsledků naměřených po 24 hodinách.

Závěrem lze konstatovat, že cíle bakalářské práce byly splněny. Práce poskytla základní přehled o solubilizačních schopnostech některých tenzidů, lecithinu a SonoVue®. Byly provedeny základní experimenty. Pokud bychom chtěli podrobnější výsledky, bude potřeba dalších, cíleně zaměřených experimentů. Získané výsledky tedy mohou být využity k dalším experimentům či výzkumu v oblasti zaměřené na solubilizaci léčiv.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HARVEY, Christopher J., et al. Advances in ultrasound. Clinical radiology, 2002, 57.3: 157-177.
- [2] PRAGER, R. W., et al. Three-dimensional ultrasound imaging. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 2010, 224.2: 193-223.
- [3] HALLIWELL, M. A tutorial on ultrasonic physics and imaging techniques. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 2010, 224.2: 127-142.
- [4] LIU, Yiyao; MIYOSHI, Hirokazu; NAKAMURA, Michihiro. Encapsulated ultrasound microbubbles: therapeutic application in drug/gene delivery. Journal of controlled release, 2006, 114.1: 89-99.
- [5] YAN, Fei, et al. Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. Journal of Controlled Release, 2013, 166.3: 246-255.
- [6] WU, Junru; NYBORG, Wesley L. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. Advanced drug delivery reviews, 2008, 60.10: 1103-1116.
- [7] ARAMANOU, Marianna, et al. Genesis of ultrasonic microbubbles: a quick historical overview. Current pharmaceutical design, 2012, 18.15: 2115-2117.
- [8] AZMIN, Mehrdad, et al. How do microbubbles and ultrasound interact? Basic physical, dynamic and engineering principles. Current pharmaceutical design, 2012, 18.15: 2118-2134.
- [9] UNGER, Evan C., et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. Advanced drug delivery reviews, 2004, 56.9: 1291-1314.
- [10] Kontrastní látky v ultrasonografii [online]. České Budějovice, 2007 [cit. 2013-06-14]. Dostupné z: http://theses.cz/id/jl78aw/downloadPraceContent_adipIdno_7265. Bakalářská. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta.
- [11] DIJKMANS, P. A., et al. Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. European Journal of Echocardiography, 2004, 5.4: 245-246.
- [12] SIRSI, Shashank R. Advances in Ultrasound Mediated Gene Therapy Using Microbubble Contrast Agents. Theranostics. 2012, vol. 2, issue 12, s. 1208-1222. DOI: 10.7150/thno.4306. Dostupné z: <http://www.thno.org/v02p1208.htm>
- [13] PEYMAN, Sally A., Radwa H. ABOU-SALEH, et. al. Expanding 3D geometry for enhanced on-chip microbubble production and single step formation of liposome modified microbubbles. Lab on a Chip. 2012, vol. 12, issue 21, s. 4544-4552. DOI: 10.1039/C2LC40634A. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40634a>
- [14] Duclaux, Jacques, Die Filtration kolloider Lösungen. Kolloid-Z. 3; 126 (1908)
- [15] Bartovská, L., Šišková, M.: *Micela (asociativní)* [online]. [cit. 2008-8-3]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/
- [16] Rosen, M. J.: Surfactants and Interfacial Phenomena. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2004. 444 p. ISBN 0-471-47818-0.
- [17] VASILESCU, M., et al. Aggregation numbers and microstructure characterization of self-assembled aggregates of poly(ethylene oxide) surfactants and related blockcopolymers, studied by spectroscopic

- methods. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2001, vol. 89-90 [cit. 2008-02-14], s. 169-194. Dostupný z WWW: www.sciencedirect.com
- [18] GAO, N., et al. Surface and micelle properties of novel multi-dentate surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2007, vol. 314 [cit. 2008-04-09], s. 707-711. Dostupný z WWW: www.sciencedirect.com
- [19] OLIVA, B. L. , BARRON, A. R.: *Basics of UV-Visible Spectroscopy* [online]. 2010 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://cnx.org/content/m34525/latest/>
- [20] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [21] SINICA, A.: *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra* [online]. 2010, [cit. 2014-04-8]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf
- [22] SOMMER, L.: *Analytická spektrometrie I*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 173 s.

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

7.1 Seznam zkratk

zkratka	význam
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
SDBS	sodium dodecyl benzenesulfonate
NaCl	chlorid sodný
PAL	povrchově aktivní látka
SRG	Sudan Red G
ORO	Oil Red O

7.2 Seznam symbolů

symbol	význam
A	absorbance
ϵ	molární extinkční koeficient
c, C	koncentrace
mM	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
μM	$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
l	tloušťka absorbující vrstvy
λ	vlnová délka
ϕ	zářivý tok
Yerr	směrodatná odchylka

8 PŘÍLOHY

8.1 Příloha 1

Tab. 14: Koncentrace solubilizovaných hydrofobních solutů v CTAB, SDBS a Tritonu X-100

C(CTAB)	C (SRG)	Yerr	C (ORO)	Yerr	C (Naph)	Yerr
μM	μM		μM		μM	
1 000	1,16	0,22	0,84	0,37	215,5	104,3
10 000	11,1	0,51	2,42	0,31	387,8	139,2
50 000	56,52	4,21	5,53	1,72	637,4	96,8
75 000	73,13	4,44	14,85	8,89	547,5	40,6

Tab. 15: solubilizovaných hydrofobních solutů v SDBS

C(SDBS)	C (SRG)	Yerr	C (ORO)	Yerr	C (Naph)	Yerr
μM	μM		μM		μM	
1 000	0,27	0,1	0,36	0,05	506,08	78,19
10 000	6,24	0,46	1,94	0,81	585,80	203,35
30 000	18,75	1,12	2,94	0,95	898,01	105,52
50 000	29,74	1,58	6,69	0,3	776,97	146,05

Tab. 16: solubilizovaných hydrofobních solutů v Tritonu X-100

C(Triton)	C (SRG)	Yerr	C (ORO)	Yerr	C (Naph)	Yerr
μM	μM		μM		μM	
1 000	2,24	0,22	4,47	1,14	654,3	23,7
10 000	15,06	0,75	19,61	2,36	1 390,6	389,2
50 000	58,28	1,12	68,69	20,01	2 186,7	438,5
75 000	95,3	1,37	59,85	10,89	2 233,6	152,1

Tab. 17: Koncentrace solubilizovaných hydrofobních solutů v lecithinu a v SonoVue®

C(Lecithin)	C (SRG)	Yerr	C (ORO)	Yerr	C (Naph)	Yerr
$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	μM		μM		μM	
10	1,26	0,06	5,85	0,15	217,81	0,42
50	0,88	0,04	2,75	0,07	207,73	0,43
100	1,46	0,09	17,19	4,88	416,68	1,43
1 000	10,31	0,08	11,16	0,07	364,98	1,30

Tab. 18: Koncentrace solubilizovaných hydrofobních solutů v SonoVue®

C (SonoVue®) po 24 h	C (SRG)	Yerr	C (ORO)	Yerr	C (Naph)	Yerr
25 mg lyofilizovaného prášku/5 ml fyz. roztoku	μM		μM		μM	
	17,36	8,54	-	-	232,30	71,15

C (SonoVue®) po 78 h	C (SRG)	Yerr	C (ORO)	Yerr	C (Naph)	Yerr
25 mg lyofilizovaného prášku/5 ml fyz. roztoku	μM		μM		μM	
	6,20	0,05	3,20	0,03	203,38	3,68

8.2 Příloha 2



Obr. 21: UV-VIS spektrofotometr, Cary Probe 50, Varian

8.3 Příloha 3

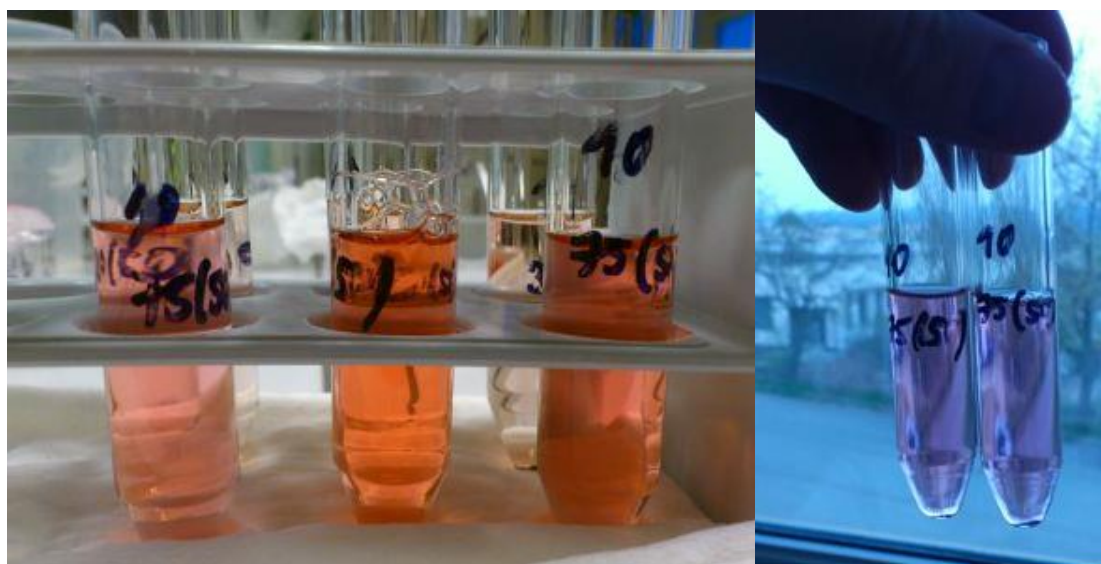


Obr. 22: Zásobní roztoky tenzidů a lecithinu

8.4 Příloha 4



Obr. 23: Vzorky před centrifugací



Obr. 24: Vzorky po centrifugaci



Obr. 25: Vzorky SonoVue®